

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR L'ANTAGONISME

ENTRE LES BACILLES DU CHARBON ET CEUX DU PUS BLEU

PAR LE D^r N. BLAGOVESTCHENSKY, DE SAINT-PÉTERSBOURG.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

I

On peut considérer actuellement comme bien établi le fait de l'abolition de l'action pathogène de certains microbes, abolition produite par la présence d'autres bactéries.

M. Pasteur ¹ a déjà remarqué que les bactéries charbonneuses, inoculées simultanément avec d'autres bactéries, ne se développent pas dans le corps de l'animal et ne provoquent pas chez lui de charbon, et il en concluait, dans sa vue large des choses, que « tous ces faits autorisent peut-être les plus grandes espérances au point de vue thérapeutique ». L'étude systématique de cette question est pourtant récente et due principalement à l'initiative d'Emmerich ², qui, sur des lapins, a mis le streptocoque de l'érysipèle en présence de la bactérie charbonneuse; à cet effet, dans une première série d'expériences, il

1. Études sur la maladie charbonneuse. *Compt. rend. Acad. Sciences*, 1877, t. 93, p. 107.

2. La guérison du charbon. *Arch. f. Hygiene*, t. VI, p. 442.

infectait préalablement les animaux avec le streptocoque de l'érysipèle avant de leur faire les inoculations de bactéries charbonneuses. Dans une autre série, il introduisait sous la peau des animaux, qui présentaient déjà les symptômes caractéristiques de l'infection charbonneuse, une culture sur bouillon du streptocoque de l'érysipèle. Dans une troisième série, il a étudié l'influence d'une culture du streptocoque de l'érysipèle introduite dans le tissu cellulaire sous-cutané au point même où s'était déjà formée l'infiltration caractéristique du charbon.

La dernière série de ses expériences se rapporte aux résultats qu'on obtient en introduisant une culture de streptocoque dans l'appareil circulatoire des animaux atteints du charbon.

De toutes ces recherches, Emmerich arrive à conclure que le streptocoque de l'érysipèle s'oppose au développement des bactéries, puisqu'il est arrivé de cette façon à empêcher, chez un grand nombre d'animaux, l'infection charbonneuse de se produire, et à sauver ceux des animaux qui présentaient déjà les signes caractéristiques de l'infection charbonneuse.

MM. Watson-Cheyne¹ et Pavlovsky² ont, d'une façon générale, confirmé les faits mis en évidence par Emmerich. Le premier de ces auteurs introduisait dans l'appareil circulatoire des lapins une culture de bactérie charbonneuse, et faisait immédiatement suivre cette injection d'une autre contenant une culture du streptocoque de l'érysipèle. Les animaux tombaient malades, mais se rétablissaient au bout d'un certain temps. M. Pavlovsky a démontré en plus que d'autres bactéries, comme la bacille de Friedländer, ou le *micrococcus prodigiosus*, sont aussi capables de contrecarrer l'action pathogène des bacilles du charbon.

M. Bouchard³ a démontré que les bacilles du pus bleu possédaient la même propriété. M. Frendeureich⁴ a entrepris une série d'expériences sur des lapins et des cobayes qui présentaient déjà l'infection charbonneuse aux différents stades de son développement; il inoculait à ces animaux des cultures pures et des

1. *London Medical Record*, 1887.

2. De la guérison du charbon par les bactéries et de la manière d'être du charbon dans l'organisme. *Virchow's Archiv.*, 1887, t. CVIII, p. 494.

3. *Comptes rendus Ac. des Sc.*, avril 1888.

4. Sur l'action du bacille pyocyanique sur la bactérie charbonneuse. *Annales de micrographie*, 1889, n° 10.

cultures stérilisées du pus bleu. En se basant sur ces recherches, il arrive à la conclusion que l'influence du bacille pyocyanique se manifeste chez ces animaux par un ralentissement de l'évolution de l'infection charbonneuse.

MM. Guignard et Charrin¹ ont examiné, sur des cobayes, l'action des cultures mélangées du charbon et du pus bleu. Ils ont trouvé que la virulence des bactériidies diminue considérablement au bout d'un certain temps, et que, bien que les animaux périssent, la survie est notablement augmentée.

MM. Woodhead et Cartwright Wood² ont étudié, dans leurs expériences sur des animaux, l'action des cultures stérilisées du pus bleu sur l'évolution du charbon; ils introduisaient sous la peau des animaux, infectés préalablement de charbon, des cultures stérilisées du pus bleu. Ils sont arrivés à arrêter, de cette façon, le développement fatal du charbon, et un certain nombre d'animaux se rétablissaient.

M. Bouchard³, après avoir reproduit les expériences des auteurs précédents, est toutefois arrivé à des conclusions différentes. Ce savant, sans nier une certaine influence des cultures stérilisées du pus bleu sur le ralentissement de l'évolution du charbon, n'a pourtant jamais vu les animaux guérir d'une façon définitive.

Parcontre, M. Buchner⁴, qui a examiné l'action des cultures stérilisées du bacille de Friedlaender sur l'évolution du charbon, est arrivé à des conclusions qui confirment pleinement les résultats obtenus par MM. Woodhead et Cartwright Wood. Il a de plus remarqué que, sous ce rapport, l'action des cultures stérilisées du bacille est sensiblement plus forte que celle des cultures non stérilisées du même microorganisme.

Si, d'une façon générale, on admet comme démontré le fait de l'action thérapeutique des bactéries, il est nécessaire de se demander par quel mécanisme ces bactéries exercent cette action réciproque les unes sur les autres. Y a-t-il une influence directe

1. Action du bacille pyocyanique sur la bactériidie charbonneuse : *Comptes rendus Acad. Sc.*, avril 1889.

2. De l'action antidotique exercée par les liquides pyocyaniques sur le cours de la maladie charbonneuse. *C. R. Ac. Sc.*, t. CIX, n° 26, 1889.

3. Action des produits secrétés par les microbes pathogènes, Paris, 1890.

4. Sur l'infection charbonneuse et la fièvre aseptique. *Berl. klin. Wochenschr.*, n° 48, 1890.

d'une espèce de bactérie sur l'autre, ou bien l'organisme infecté intervient-il lui-même dans le procès ?

MM. Emmerich et Freudenreich admettent la dernière explication, car, d'après leurs recherches, le streptocoque de l'érysipèle et le bacille du pus bleu n'empêchent pas le développement des bactériidies charbonneuses dans les cultures artificielles, où tous les trois poussent fort bien les uns à côté des autres. L'obstacle que ces microbes opposent au développement du charbon dans l'organisme, s'expliquerait parfaitement, si l'on admettait qu'ils exercent une action excitante sur les cellules des tissus.

M. Charrin¹, qui a examiné cette question au point de vue de l'antagonisme qui existe entre les bacilles du pus bleu et les bactériidies charbonneuses, est arrivé à conclure que le premier, le bacille pyocyannique, « atténue la bactériдие charbonneuse en sécrétant des substances nuisibles pour elle, mais qu'il l'atténue également en épuisant les milieux nutritifs ». Dans l'organisme, cette atténuation facilite peut-être l'activité des phagocytes, activité à laquelle viendraient ajouter encore d'autres facteurs qui, jusqu'à présent, ont échappé à l'attention des observateurs.

II

Pour élucider d'une façon plus précise ce rôle thérapeutique du microorganisme, nous avons entrepris, sous la direction de M. Metchnikoff, des recherches spéciales qui se rapportent plus particulièrement à l'action qu'exerce, sur le bacille du charbon, le bacille pyocyannique, c'est-à-dire le microbe le mieux étudié au point de vue de l'antagonisme des bactéries.

Pour circonscrire plus étroitement la question, nous avons fait les inoculations de ces deux microorganismes dans la chambre antérieure de l'œil des lapins et des cobayes, afin de pouvoir suivre avec plus de facilité, dans cette région, la marche des phénomènes.

Nous avons inoculé, pour ces expériences, onze lapins, dont chacun a reçu, dans la chambre antérieure de l'œil, simultanément

¹ *Maladie pyocyannique*, p. 413, 1889.

ment, la valeur de ce qui peut tenir sur une anse de platine, de deux cultures récentes du même âge, sur gélose, l'une de charbon, l'autre de bacilles du pus bleu. L'œil étant maintenu à découvert par le blépharostat de Kelley, on faisait avec le couteau de Graefe une incision large de 1^{mm} à $1^{\text{mm}}\frac{1}{2}$, par laquelle on introduisait l'anse de platine, et, pour éviter toute infection secondaire, l'œil en expérience était lavé deux ou trois fois par jour avec de l'eau distillée, ce qui assurait, autant que possible, la propreté de la muqueuse conjonctivale.

Les lésions locales sont, au point de vue anatomo-pathologique, à peu près les mêmes chez tous les animaux. Déjà, pendant les premières heures qui suivent l'inoculation, la sécrétion de la conjonctive devient plus abondante; les vaisseaux de la muqueuse s'injectent fortement et prennent une coloration rouge intense. Au bout de 12 heures, le segment supérieur de la chambre antérieure devient trouble, d'un gris sale; au bout de 24 heures, les sécrétions de la conjonctive deviennent plus prononcées; la pupille est à peine visible, la chambre antérieure étant presque entièrement remplie d'exsudat. Au bout de 48 heures, on ne trouve pas de modification dans les phénomènes qui viennent d'être décrits, seulement il est absolument impossible de distinguer la pupille et l'iris. Au bout de 72 heures, l'hypopion est encore plus prononcé, et en même temps on trouve chez quelques animaux un œdème sur la conjonctive de la paupière supérieure. Les sécrétions paraissent moins abondantes. Au bout de 96 heures, la cornée commence à prendre une teinte mate, tout en conservant sa forme normale. A partir de ce moment, la sécrétion de la conjonctive commence à diminuer, et la tuméfaction à disparaître. Au bout de 120 heures, la sécrétion anormale de la conjonctive se tarit.

Tandis que chez quelques animaux on observait le développement d'une panophtalmie, chez d'autres la chambre antérieure perdait sa forme habituelle à la suite de l'affaissement de la cornée; les processus inflammatoires diminuaient d'intensité, et le globe oculaire commençait à s'atrophier. D'une façon générale, chez presque tous les animaux soumis à nos expériences, on pouvait constater, vers la fin de la seconde ou au commencement de la troisième semaine, une atrophie totale du globe oculaire.

Pour l'étude, on prélevait une certaine quantité d'humeur

aqueuse, à l'aide d'une pipette en verre, dont les extrémités étaient effilées en tubes capillaires, et qu'on n'introduisait, à travers l'incision de la cornée, dans la chambre antérieure de l'œil, qu'après l'avoir préalablement stérilisée.

Tant que cela a été possible, on a procédé de cette manière, et nous avons pu ainsi retirer du liquide au bout de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120 et même 133 heures après l'inoculation.

De cette humeur aqueuse, une partie était déposée sur une lamelle de verre, et l'autre partie servait pour ensemençer soit de la gélatine versée ensuite dans un cristalliseur de Petri, soit de la gélose renfermée dans des tubes. Dans ce dernier cas, l'ensemencement se faisait en stries. Grâce à ce procédé, nous étions en possession d'un double contrôle.

La couche mince d'humeur aqueuse, desséchée sur la lamelle de verre, servait à faire une préparation qu'on colorait avec une solution aqueuse de bleu de méthyle, et qu'on examinait avec le microscope Zeiss $\frac{AA}{12}$ ou $\frac{DD}{12}$. Cet examen a permis de constater les faits que voici.

Dans l'humeur aqueuse recueillie au bout de 6 heures, on trouve une masse de leucocytes ; les bactériidies charbonneuses et les bacilles pyocyaniques sont bien colorés ; par places, on trouve des phagocytes qui renferment déjà une et parfois deux bactériidies.

Au bout de 12 heures, les leucocytes sont devenus plus nombreux, mais l'activité des phagocytes paraît également augmentée, et on en trouve qui renferment 2 ou 3 bactériidies. Quant aux bacilles pyocyaniques, ils sont libres et entourent les leucocytes et les bactériidies. Au bout de 18 à 24 heures, on trouve déjà des phagocytes qui paraissent comme bondés de bactériidies, et quelquefois comme crevés, sans avoir pu conserver leur forme.

Au bout de 36 à 48 heures, les bactériidies commencent à se modifier, elles deviennent comme cassées, granuleuses, et leurs fragments sont situés dans les phagocytes qui les ont absorbées. Les bacilles du pus bleu sont, comme auparavant, libres et en grand nombre. Au bout de 12 à 96 heures, il devient déjà difficile de découvrir, sur les préparations, des bactériidies, qui du reste ne conservent plus leur forme régulière ; de plus elles se colorent mal et leurs contours restent pâles.

A partir de ce moment, les phagocytes commencent à absorber

es bacilles pyocyaniques dont ils sont quelquefois littéralement remplis. Dans un seul cas seulement nous avons pu trouver encore des bactériidies, 115 heures après l'inoculation; aussi nous croyons-nous autorisé à considérer cet espace de temps comme l'extrême limite de la survivance des bactériidies charbonneuses; quant aux bacilles pyocyaniques, nous en trouvons encore 135 heures après l'inoculation, c'est-à-dire presque jusqu'au moment où le globe oculaire commençait à s'atrophier.

Sur 11 lapins inoculés (voy. l'Annexe 1), 3 sont morts, l'un au bout de 70 heures, l'autre au bout de 120, le troisième au bout de 7 jours; nous n'avons pu obtenir des cultures de bacille pyocyanique qu'avec les organes du troisième lapin. Quant aux cultures de charbon, il était impossible d'en obtenir avec les organes d'aucun de ces lapins.

8 lapins ont survécu, et un à deux mois après l'inoculation ils ont été examinés au point de vue de l'immunité. Sur ces 8 lapins, un seul a pu supporter une nouvelle infection charbonneuse, les autres ont succombé.

4 lapins témoins, inoculés en même temps que les lapins qui nous ont servi pour les expériences précédentes, avec la même quantité de la même culture charbonneuse, ont tous succombé au charbon dans les espaces de temps respectifs de 58 heures, 65 heures, 65 heures et 6 jours après l'inoculation.

Sur 6 cobayes inoculés dans l'œil de la même façon que les lapins, 3 ont succombé à la maladie pyocyanique, le premier au 4^e jour après l'inoculation, le second au 5^e, le troisième au 8^e. Pas un n'a présenté de symptômes de charbon.

3 ont survécu à l'inoculation, mais inoculés encore une fois, un à deux mois après les premières expériences, ils ont tous succombé au charbon dans les espaces de temps respectifs de 36 heures, 42 heures et 46 heures.

Cette série d'expériences permet la conclusion suivante : *L'inoculation simultanée dans l'œil des bacilles pyocyaniques et des bactériidies, s'oppose dans la grande majorité des cas au développement de ces dernières, sans toutefois rendre les animaux, à quelques exceptions très rares près, réfractaires à une infection charbonneuse ultérieure.*

Dans une autre série d'expériences portant sur 5 lapins (voy. l'annexe 2), les cultures de bacille pyocyanique et de charbon

furent introduites non pas toutes les deux dans le même œil, mais séparément chaque culture dans chaque œil. 3 de ces animaux ont succombé au charbon, l'un 54 heures, l'autre 78 heures et le troisième 65 heures après l'inoculation. Le quatrième a succombé le 5^e jour, le cinquième 72 heures après l'inoculation, tous les deux à la maladie pyocyannique, bien qu'on ait trouvé dans certains organes des bactériidies dégénérées. Ces expériences démontrent que les *bacilles pyocyaniques*, inoculés à une certaine distance des bactériidies, exercent sur ces dernières une action beaucoup moins intense.

Pour pénétrer un peu plus avant dans le mécanisme de ces phénomènes, nous avons introduit, chez 4 lapins, dans l'œil, un fil de soie chargé de spores de charbon et enduit par-dessus d'une culture (de 4 jours) sur gélose de bacilles pyocyaniques (v. Ann. 3). L'examen de ces fils, retirés 24 heures après l'introduction, a montré *l'absence de tout bourgeonnement des spores de bactériidies*. Ces expériences montrent d'une façon nette que la présence des bacilles pyocyaniques exerce une action directe très marquée sur le développement du charbon, puisque les spores charbonneuses (comme le démontrent les expériences nombreuses de M. Metchnikoff), introduites dans l'œil des animaux même réfractaires, s'y développent facilement. Nous devons encore ajouter que les fils, retirés de l'œil, étaient ensuite mis dans du bouillon afin de voir si les spores qui se trouvaient sur ces fils étaient susceptibles de développement. Or, dans tous ces cas, on constatait très nettement, 24 heures après, un développement considérable des bactériidies charbonneuses.

III

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les bacilles du pus bleu n'ont d'action sur les bactériidies que lorsqu'ils sont dans leur voisinage immédiat. Cette conclusion est appuyée par des expériences d'inoculation des deux bacilles dans le sang (Ann. n° 4). En injectant dans la veine de l'oreille de 4 lapins, 1^{cc} de culture récente de pus bleu, et aussitôt après 1^{cc} de culture de bactériidies, j'ai obtenu une infection mixte, qui faisait succomber ces animaux après 2, 4 et 5 jours.

Les préparations et les cultures faites avec les organes démontrèrent que les bacilles du pus bleu étaient concentrés dans leur lieu de prédilection, les reins, et les bactériidies surtout dans la rate. Le procès morbide a été ralenti, mais le charbon n'a pas été arrêté, ce qui démontre que, dans l'antagonisme des deux espèces de bacilles dans l'organisme, l'influence du bacille du pus bleu ne se manifeste sur les bactériidies que lorsqu'elle est directe.

Afin de déterminer plus exactement le rôle des bacilles du pus bleu dans ces phénomènes d'antagonisme, j'ai fait, à l'exemple de plusieurs de mes prédécesseurs, une série d'expériences d'inoculation de bactériidies et de cultures stérilisées du pus bleu.

J'ai commencé par faire ces inoculations dans la chambre antérieure de l'œil. (Ann. n° 5.)

Pour cela, on aspirait à l'aide d'un tube stérilisé une quantité suffisante d'humeur aqueuse, et on injectait de suite, par l'orifice d'extraction, et ~~cour~~ sur coup, deux à trois gouttes d'une culture stérilisée de pus bleu dans du bouillon, et la même quantité d'une culture charbonneuse à peu près du même âge. Sur plusieurs lapins de la même série, cette culture charbonneuse a été remplacée par un fil de soie chargé de spores de charbon.

Sur 8 lapins ainsi traités, 7 sont morts du charbon, ce qui prouve que la culture du bacille du pus bleu n'avait pas empêché le développement des bacilles charbonneux ni la germination de leurs spores. Un seul lapin, mort le 5^e jour, ne présentait pas les symptômes du charbon.

6 autres lapins (v. les Annexes 6 et 7) ont reçu sur le même point du corps, par voie d'injection sous-cutanée, et simultanément, 1 à 2^{cc} de culture stérilisée du pus bleu et autant d'une culture du bacille du charbon dans du bouillon; un seul de ces lapins succomba le 23^e jour, et de plus sans symptômes charbonneux, tandis que tous les autres résistèrent. Les cultures stérilisées du pus bleu sont donc en état d'entraver le développement des bactériidies injectées au même point. On injecta alors, sous la peau de l'abdomen de 6 autres lapins, 1^{cc} de culture charbonneuse, et ensuite, autour du point d'injection, à la distance d'un centimètre, on fit des inoculations de 1/2 jusqu'à 1^{cc} de culture stérilisée du pus bleu dans du bouillon. Ces dernières inoculations furent répétées toutes les 24 heures pendant 4 à 5 jours. Sur ces

lapins, 4 résistèrent tandis que les 2 autres, ainsi que le témoin, inoculé par le charbon seul, succombèrent ¹. L'immunité des 9 lapins qui avaient ainsi résisté à l'inoculation mixte du bacille du pus bleu et du charbon fut éprouvée, de un mois à un mois et demi après la première expérience, période après laquelle les animaux avaient augmenté de poids. L'injection fut faite sous la peau de l'abdomen avec une émulsion d'organes d'un cobaye, mort 36 heures après l'inoculation du charbon. De ces 9 lapins, 4 résistèrent, tandis que 5 succombèrent au charbon.

Ce résultat diffère beaucoup de celui que nous avons obtenu en essayant l'immunité des lapins ayant résisté à l'inoculation mixte de charbon et de cultures vivantes du pus bleu : ceux-ci avaient succombé, dans la proportion de 10 sur 11, à l'inoculation d'épreuve. Ici, 4 sur 9 ont résisté. La culture stérilisée du bacille du pus bleu influence donc le développement des bactériidies à un degré plus faible que la culture vivante, et leur permet de produire un plus haut degré d'immunité.

On soumit, dans une autre série d'expériences, 4 lapins à des injections réitérées de cultures stérilisées du pus bleu ; 2 de ces lapins en reçurent 8^{cc}, et 2, 16^{cc}. Après la dernière injection, ces lapins furent inoculés sous la peau avec une culture charbonneuse sur gélose. Tous ces lapins succombèrent au charbon : 2 après 70 et 73 heures, et 2 (un de chaque paire) après 10 et 11 jours.

En résumé, les bacilles stérilisés du pus bleu peuvent donc influencer à un certain degré le développement des bactériidies, conformément aux assertions de MM. Wood et Woodhead. Mais cela exige une grande quantité de culture stérilisée ; ainsi, dans les injections dans l'œil, où on ne peut introduire que des quantités minimales de ces cultures, les lapins succombent presque toujours au charbon.

IV

Après avoir constaté l'action directe des bacilles pyocyaniques sur les bactériidies introduites dans l'organisme, il était

1. Un de ces lapins, inoculé avec une culture stérilisée du pus bleu, succomba au charbon seulement 3 semaines après l'inoculation.

nécessaire d'étudier l'antagonisme de ces deux bacilles en dehors de l'organisme pour voir s'il était vrai, comme l'admet M. Freudenreich¹, que les bacilles pyocyaniques n'exercent pas, dans ces conditions, d'influence sur les bactériidies.

Afin d'établir ce point, nous avons fait plusieurs séries d'expériences. Nous avons tenté d'abord desensemencements des deux bacilles sur des plaques de gélose (cristallisoirs de Pétri), en traçant à la surface de la gélose deux diamètres perpendiculaires : l'un avec un fil de platine chargé d'une culture de pus bleu, l'autre avec un autre fil enduit d'une culture de charbon. Sept cristallisoirs ainsi ensemencés sont portés dans la même étuve, dont la température oscillait entre 33° ou 34°. Au bout de 24 heures on retire le cristallisoir n° 1, et on constate que les deux espèces de bacilles se sont développées d'une façon normale.

Après 48 heures, on examine le cristallisoir n° 2. Presque partout, sur tous les points de la surface, la couche de gélose présente des reflets vert tendre. La strie formée de culture de charbon est comme bordée par les cultures de pus bleu. On prend sur une lamelle l'empreinte du point d'intersection des deux stries d'où sont parties les cultures, et, en faisant avec cette lamelle une préparation colorée, on y trouve un développement rapide et considérable de bacilles pyocyaniques, tandis que les bactériidies, à peine plus nombreuses que sur les préparations identiques faites avec le cristallisoir n° 1, n'en présentent pas moins un aspect absolument normal.

Au bout de 72 heures, le cristallisoir n° 2 présente sur toute sa surface une coloration verte. Au point d'intersection des cultures, celles du pus bleu paraissent former une couche plus épaisse, de sorte qu'à ce niveau on distingue à peine les stries. Sur les préparations colorées faites avec cette région de la culture, on trouve presque partout des bacilles pyocyaniques; en même temps les bactériidies paraissent avoir perdu leur conformation normale : quelques-unes ne sont colorées qu'à moitié, d'autres paraissent déchirées, d'autres encore renferment une masse granuleuse, inégalement distribuée le long d'une même

1. Antagonisme des bactéries. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, n° 4, 1888. — De l'antagonisme des bactéries. *Annales de micrographie*, t. II, n° 1, 1889.

ligne. Toutes ces modifications témoignent nettement de l'état de dégénérescence dans lequel se trouvent les bactériidies.

Mais il n'en est pas de même des cultures prises le long de la strieensemencée avec du charbon : dans ces cultures, toutes les bactériidies ont conservé leur aspect et leur configuration normale.

C'est donc à partir du 3^e jour que les bacilles pyocyaniques commencent à étouffer le développement normal des bactériidies dans les cultures.

L'examen du cristalliseur n° 4 est fait au bout de 96 heures.

Sur les préparations faites avec les cultures prises au point d'entrecroisement, on trouve presque exclusivement une quantité considérable de bacilles pyocyaniques, et par place quelques débris de bactériidies. A partir du point d'entrecroisement jusqu'au milieu de la strie, les bactériidies commencent également à dégénérer, et ce n'est qu'aux extrémités de la ligne de culture qu'on trouve des bacilles du charbon ayant conservé leur structure normale. Toute la surface de la couche de gélose présente une coloration franchement verte.

Au bout de 120 heures on examine le cristalliseur n° 5. La surface des cultures commence à se dessécher ; la coloration est franchement verte. Les cultures de charbon n'existent qu'aux extrémités des stries, où elles sont entourées d'une bordure formée par les cultures de pus bleu. Sur les préparations colorées de cultures prises au point d'intersection, on ne trouve que des bacilles pyocyaniques, et on constate l'absence totale des bactériidies. La dégénérescence de ces dernières est très manifeste tout le long des stries. Sur les extrémités, où on trouve une quantité considérable de bacilles pyocyaniques, les bactériidies ont conservé leur conformation normale.

Le cristalliseur n° 6 est examiné au bout de 144 heures. La surface des cultures est sèche, de sorte qu'il était assez difficile d'obtenir l'empreinte du point d'entrecroisement. Aux extrémités de la strie formée par les cultures de charbon, on constate le commencement de la dégénérescence des bactériidies, toutefois on observe encore la formation de spores. Un certain nombre de bactériidies se colorent encore bien et conservent leur configuration normale. Les bacilles du pus bleu sont, comme toujours, en quantité considérable.

Au bout de 168 heures, la couche de gélose contenue dans le cristalliseur n° 7 paraît imbibée, dans toute sa profondeur, d'une couleur vert foncé. La surface des cultures est tellement sèche qu'il a été impossible d'avoir une empreinte sur la plaque de verre. Sur les préparations de culture de charbon, prises aux extrémités de la strie avec un fil de platine, et délayées dans de l'eau distillée sur la lamelle de verre, on trouve une dégénérescence très avancée des bactéridies, dont quelques-unes ont eu le temps de donner lieu à la formation de spores, bien qu'en quantité peu considérable. Quant aux bacilles pyocyaniques, on en trouve partout des quantités considérables.

Ces expériences, refaites plusieurs fois, ont toujours donné le même résultat.

Elles démontrent donc que, *même en dehors de l'organisme, les bacilles pyocyaniques exercent une action d'arrêt très marquée sur le développement des bactéridies.*

Dans la série d'expériences qui suit, les cultures étaient placées sous des cloches, dans la chambre humide. Ce qui nous a frappé dans le développement des cultures de ces deux bacilles placées dans la chambre humide, dans une goutte suspendue, c'est que la simple existence des bacilles pyocyaniques à côté des bactéridies paraissait déjà exercer une influence fâcheuse sur le développement de ces dernières. Ainsi, nous avons remarqué qu'en plaçant tout près de la culture de pus bleu, une goutte de bouillon contenant des morceaux de fil de soie chargé de spores, ces spores, très souvent, ne se développaient pas en bactéridies, tandis que dans les gouttes suspendues de bouillon, contenant du même fil de soie chargé de spores, mais mises dans une chambre humide où il n'y avait pas de bacilles pyocyaniques, on trouvait toujours un développement abondant de bactéridies.

Ce phénomène bien constaté m'a conduit à étudier pas à pas l'influence des cultures stérilisées de pus bleu sur le développement des spores de charbon.

En suivant comparativement, sur des gouttes pendantes portées par des lamelles excavées et placées côte à côte dans une même chambre humide, le développement de spores charbonneuses placées tantôt dans des cultures stérilisées inégalement vieilles de bacilles de pus bleu, tantôt dans du bouillon pur, on pouvait se rendre compte de l'influence des cultures stéri-

lisées de pus bleu sur le développement des spores de charbon, à commencer par les cultures de pus bleu âgées de 12 heures jusqu'aux cultures âgées de 6 semaines.

Si l'on se rapporte à l'annexe 9, on voit que les cultures jeunes de pus bleu n'exercent pas la moindre influence sur le développement des spores. Avec les cultures plus âgées on constate des oscillations : tantôt les spores ne se développent pas du tout, tantôt elles se développent, mais d'une façon très peu marquée. Quand les cultures sont âgées de 5 semaines ou encore plus vieilles, l'influence du pus bleu sur le développement des spores diminue notablement, tandis que, dans ce cas, on observe presque toujours la transformation des spores en bactériidies. Chaque fois que les spores ne présentaient pas de développement normal dans la goutte contenant les cultures stérilisées, le fil de soie était transporté sur du bouillon, où il donnait toujours lieu au développement des bactériidies.

On voit donc que les résultats de nos expériences diffèrent notablement de ceux obtenus par M. Freudenreich. Les différences s'expliquent par ce fait que cet auteur prenait des cultures vieilles de 3 à 6 semaines, et les filtrait avant de les soumettre à l'expérience.

C'est que la filtration, en retenant les bacilles qui certainement renferment les produits les plus actifs de leurs échanges, affaiblit plus les propriétés du liquide que la stérilisation.

Pour le montrer, je filtrais d'un côté sur le filtre Chamberland, et je stérilisais de l'autre, des cultures du bacille du pus bleu dans du bouillon; puis je répartissais ces liquides, par portions de 3^{cc}, dans de petits tubes que j'enseménçais avec des fils de soie chargés de spores. Le liquide stérilisé avait une coloration verte, bien plus intense que le liquide filtré. Pour le contrôle, on enseménçait des fils de soie chargés de spores, dans 3^{cc} de bouillon neuf contenus dans d'autres tubes.

Ces expériences ont été faites avec des cultures de pus bleu vieilles de 8 jours, de 10 jours, de 2 semaines et de 3 semaines, et on a trouvé que, dans les cultures stérilisées, il n'y avait pas de développement de spores en bactériidies, même au bout de 48 heures, tandis que, dans les cultures filtrées, les spores se sont bien développées, bien qu'en quantité moindre que dans le bouillon pur.

Pour établir encore plus solidement cette différence frappante dans le développement des spores du charbon, dans les cultures stérilisées et les cultures filtrées de pus bieu, nous avons recommencé ces essais en étudiant, en gouttes suspendues, la germination des spores dans ces deux sortes de liquides, obtenus par filtration ou stérilisation de cultures d'âges divers jusqu'à 4 semaines inclusivement, M. Freudenreich s'étant servi de cultures âgées de 3 à 6 semaines.

Les résultats obtenus dans ces nouvelles conditions d'expérience ont confirmé les données de la série précédente : dans les cultures stérilisées, les spores ne se développaient pas, tandis que dans les cultures filtrées on trouvait des bactériidies au bout de 24 heures.

Enfin, en opérant sur des cultures stérilisées délayées les unes avec du bouillon pur, les autres avec de l'eau distillée, nous avons vu le développement se faire partout, mais être plus intense dans les premières que dans les dernières.

Nous tenons à ajouter ici quelques expériences sur l'influence du pus bleu stérilisé sur le sang charbonneux.

Une série de gouttes suspendues, faites avec le sang frais d'un cobaye mort du charbon en 38 heures, étaient placées sur des lamelles creuses, dont l'excavation contenait quelques gouttes de liquide, formé tantôt de bouillon pur, tantôt de cultures stérilisées du bacille du pus bleu. J'ai toujours vu, en présence de ces dernières, les bactériidies frappées de dégénérescence, tandis qu'elles restèrent normales en présence du bouillon.

Il résulte de toutes ces expériences que le seul *voisinage des produits de l'activité vitale des bacilles pyocyaniques, composés d'une sorte de substance volatile* (en ouvrant ces chambres humides on était toujours frappé d'une odeur forte, désagréable), *exerce une influence nuisible sur le développement des bactériidies.*

Il résulte très nettement de l'étude que nous venons de faire que dans l'antagonisme qui existe entre les bactériidies et les bacilles pyocyaniques, ces derniers paraissent être les plus forts aussi bien en dehors de l'organisme qu'à son intérieur.

Leurs avantages dépendent de l'action directe de leurs produits sur les bactériidies dont ils arrêtent l'activité physiologique.

Bien que ce résultat soit ici des plus nets et des plus constants, il ne faudrait pas le généraliser et l'appliquer à tous les cas d'antagonisme entre d'autres espèces de bactéries dans l'organisme, car il est très probable que le procès ne se règle pas toujours de la même façon.

En terminant ce travail, je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à M. Metchnikoff pour les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer tout le temps que j'ai travaillé sous sa direction.

ANNEXE N° 1.

Introduction simultanée, dans la chambre antérieure de l'œil des animaux, de cultures du charbon et de cultures du pus bleu.

Exp. I. — 20 janvier 90. Lapin; la température, de 39°,8 avant l'opération, atteint le maximum de 40°,8, 23 heures après; diarrhée intense le 3^e jour; elle disparaît le 8^e; commencement de l'atrophie du globe oculaire le 12^e jour; la température redevient normale au commencement de la 4^e semaine. Le lapin a survécu. Perte de poids : 260^{gr}.

Exp. II. — 24 janvier 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,6 à 41°,4, 48 heures après l'opération; atrophie de l'œil au 10^e jour, rétablissement à la fin de la 3^e semaine. Perte de poids : 320^{gr}.

Exp. III. — 31 janvier 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,7 à 41°,3, 42 heures après l'opération; atrophie totale de l'œil le 14^e jour; rétablissement au bout de 3 semaines. Perte de poids : 300^{gr}.

Exp. VIII. — 13 février 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,8 à 41°,2, 47 heures après l'opération. Diarrhée de 48 heures, le 4^e jour. Atrophie de l'œil le 11^e jour; rétablissement vers la fin de la 4^e semaine. Perte du poids : 325^{gr}.

Exp. XIII. — 1^{er} avril 90. Lapin mort en 70 heures. La température monte de 39°,9 à 41°,30 heures après l'opération. Le second jour, diarrhée intense qui se continue jusqu'à la mort. A l'autopsie; rate normale, hypérémie et, par place, petites suffusions sanguines de la muqueuse intestinale. Les autres organes ne présentent pas de modifications apparentes. — L'ensemencement des milieux nutritifs, fait avec les organes 48 heures après la mort, à une température de 33°, ne donne pas lieu au développement des cultures; sur les préparations microscopiques, faites avec les mêmes organes, on ne trouve ni bacilles pyocyaniques, ni bactériidies.

Exp. XIV. — 1^{er} avril 90. Lapin mort en 120 heures. La température monte de 40° à 41°,7, 60 heures après l'opération. Diarrhée sanguinolente incoercible au 2^e jour, se continue jusqu'à la mort de l'animal. A l'autopsie: rate petite, anémiée; infarctus des poumons, particulièrement au niveau du lobe inférieur droit. Dans l'intestin, lésions de l'entérite. Foie, reins et cœur ne présentent pas de modifications apparentes. — L'ensemencement des organes sur de la gélose et sur du bouillon ne donne pas lieu, au bout de 48 heures, au développement des cultures. Sur les préparations microscopiques faites avec les organes frais, on ne trouve ni bactériidies, ni bacilles pyocyaniques.

Exp. XV. — 1^{er} avril 90. Lapin, qui a survécu. La température monte de 39°,9 à 41°,7, 30 heures après l'opération. Commencement de l'atrophie de l'œil le 12^e jour, rétablissement vers la fin de la 5^e semaine. Perte de poids: 345^{gr}.

Exp. XVII. — 1^{er} avril 90. Cobaye mort en 96 heures. Hypopion très marqué au bout de 48 heures. A l'autopsie: rate petite, anémiée; pas de modifications dans les autres organes. Sur des préparations avec les organes frais, ni bactériidies, ni bacilles pyocyaniques. L'ensemencement des organes sur bouillon ou gélose ne donne pas lieu, au bout de 48 heures, au développement des bactériidies, mais à des cultures très riches de bacille pyocyanique.

Exp. XVIII. — 1^{er} avril 90. Cobaye qui a survécu. Commencement de l'atrophie de l'œil au 8^e jour, rétablissement complet au bout de 2 semaines. Perte de poids: 43^{gr}.

Exp. XXVII. — 1^{er} avril 90. Lapin mort au bout de 7 jours. La température monte de 40° à 42°,6, 26 heures après l'opération; elle est à 37° au 6^e jour et à 36°,2, au 7^e. Paraplégie totale des extrémités postérieures, réflexes exagérés; opisthotonos au 5^e jour. Paralysie des extrémités antérieures au 6^e jour. Diarrhée. Perte de poids de 700^{gr}. Amaigrissement rapide. — A l'autopsie: rate non hypertrophiée; hypérémie des poumons; foie, reinset cœur ne présentent pas de modifications apparentes. Pas de lésions macroscopiques, ni dans le cerveau, ni dans la moelle. — L'ensemencement des organes sur gélose donne lieu au développement des cultures du bacille pyocyanique.

Exp. XXVIII. — 2 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,9 à 42°, 28 heures après l'opération. Diarrhée insignifiante le 2^e jour; atrophie de l'œil au 15^e jour. Perte de poids de 275^{gr}, redevenue nulle à la fin de la 4^e semaine.

Exp. XXIX. — Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,8 à 41°,3, 52 heures après l'opération. Panophtalmie très marquée, atrophie de l'œil au 12^e jour. Perte de poids de 340^{gr}, redevenue nulle au 34^e jour.

EXP. XXX. — 16 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,3, 50 heures après l'opération. Diarrhée insignifiante le 1^{er} jour. Atrophie de l'œil au 14^e jour; rétablissement complet après 3 semaines. Perte de poids : 295^{gr}.

EXP. XXXIII. — 16 avril 90. Cobaye mort le 8^e jour. Panophtalmie accompagnée de phénomènes très marqués. Perte de poids de 90^{gr}. A l'autopsie : rate petite, anémie; foie et poumons ne présentent pas de modifications apparentes. Couche corticale des reins couverte de petits foyers suppurés, de la dimension d'un grain de mil. Sur les préparations faites avec les organes frais, on ne trouve des bacilles pyocyaniques que dans les reins. L'ensemencement du rein a seul donné lieu au développement des cultures du bacille pyocyanique; l'ensemencement d'autres organes est resté stérile.

EXP. XXXIV. — 16 avril 90. Cobaye qui a survécu. Commencement de l'atrophie de l'œil au 9^e jour. Perte de poids de 33^{gr}. Le poids redevient normal le 19^e jour, et l'animal se rétablit.

EXP. XXXV. — 16 avril 90. Cobaye qui a survécu. Commencement de l'atrophie de l'œil au 8^e jour. Perte de poids 38^{gr}. L'animal se rétablit en 3 semaines.

EXP. XXXVI. — 16 avril 90. Cobaye mort en 3 jours. Perte de poids de 65^{gr}. — A l'autopsie : reins très hyperémiés et farcis de petits foyers purulents; rate petite et pâle. Les autres organes ne présentent pas de modifications particulières. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve des bacilles pyocyaniques seulement dans les reins. Dans des cultures sur gélose : bacille pyocyanique, quand l'ensemencement était fait avec des parcelles de reins et de poumons. L'ensemencement d'autres organes sur des milieux nutritifs à 33° (température du thermostat) reste stérile au bout de 60 heures.

EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE. — 4 lapins, ayant reçu les 20 et 24 janvier, 1^{er} et 15 avril, dans la chambre antérieure de l'œil, une inoculation du virus charbonneux des séries d'expériences précédentes, meurent du charbon au bout de : 65 heures, 6 jours, 63 heures et 58 heures avec les symptômes du charbon, et des bactériidies dans tous les organes.

ANNEXE N° 2.

Introduction simultanée des cultures de charbon ou de sang charbonneux dans un œil, et de cultures du bacille pyocyanique dans l'autre.

EXP. IX. — 23 mars 90. Lapin mort en 54 heures. La température monte de 40° à 41°,6, 30 heures après l'opération. A l'autopsie : rate hypertrophiée, de couleur foncée. Sur les préparations colorées, on trouve

des bacilles du charbon dans tous les organes. Dans les reins on trouve des bacilles pyocyaniques.

Exp. X. — 23 mars 90. Lapin mort en 78 heures. La température monte de 39°,9 à 41°,7, 32 heures après l'opération. Accélération de la respiration au bout de 48 heures. Appétit conservé jusqu'à la mort de l'animal. A l'autopsie : rate hypertrophiée, friable. Hyperémie de la substance corticale des reins. Pas de modifications particulières dans les autres organes. Sur les préparations, on trouve dans tous les organes des bactériidies et des bacilles pyocyaniques.

Exp. XI. — 28 mars 90. Lapin mort en 63 heures. La température monte de 39°,9 à 41°,9, 28 heures après l'opération. Accélération de la respiration au 2^e jour. Mêmes lésions que dans le cas précédent.

Exp. XII. — 28 mars 90. Lapin mort le 5^e jour. La température monte de 40°,1 à 41°,5, 30 heures après l'opération. Mêmes phénomènes que dans le cas précédent. En plus, dans les reins, on trouve exclusivement des bacilles pyocyaniques.

Exp. XVI. — 31 mars 90. Lapin mort en 72 heures. La température monte de 40° à 41°,6, 26 heures après l'opération. L'infiltration est bien moins marquée dans l'œil où on a introduit les cultures de charbon que dans l'œil dans lequel on a introduit les bacilles pyocyaniques. Les sécrétions de la conjonctive sont bien plus prononcées dans l'œil injecté avec du pus bleu que dans celui où se trouvent les cultures de charbon. Accélération de la respiration au 2^e jour. A l'autopsie : rate considérablement hypertrophiée ; son parenchyme est friable, de couleur rouge bleu foncé. Reins hyperémiés. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve partout des bactériidies et des bacilles pyocyaniques. L'ensemencement des organes, fait dans toutes ses expériences (5), a donné lieu au développement des cultures de bactériidies et de bacilles pyocyaniques.

ANNEXE N° 3.

Introduction dans la chambre antérieure de l'œil de spores charbonneuses et de cultures sur gélose du bacille pyocyanique.

A. Introduction simultanée — B. Introduction des spores charbonneuses 6 heures après celle du bacille. — C. Introduction des spores du charbon 40 heures après celle du bacille.

Exp. V. A. — 5 février 90. Lapin mort le 6^e jour. La température monte de 39°, 8 à 42° le 5^e jour après l'opération. Le fil de soie est retiré au bout de 24 heures : pas de développement des spores. A l'autopsie : foyers hémorragiques étendus dans les poumons ; foie et rate hyperémiés ; hyperémie intense des reins. Sur les préparations microscopiques, on ne trouve pas de

bactéridies dans les organes, mais une grande quantité de bacilles pyocyaniques. L'ensemencement des organes, particulièrement des reins, donne lieu au développement exclusif des bacilles pyocyaniques.

EXP. VI. A. — 8 février 90. Lapin mort après 5 semaines. La température monte de 39°,7 à 41° après 96 heures. Le fil de soie est retiré au bout de 24 heures. Pas de développement des spores. (Le fil mis dans du bouillon, et laissé pendant 24 heures à la température de 33°, donne lieu au développement considérable des spores.) A partir du 5^e jour, diarrhée et commencement de paralysie, qui deviennent de plus en plus prononcées jusqu'à la mort de l'animal. Amaigrissement notable. Perte de poids de 980 grammes. A l'autopsie : rate petite, pâle; pas de modifications apparentes dans les poumons, le cœur et le foie; dans les reins, un semis de petits foyers purulents. L'ensemencement donne lieu au développement du bacille pyocyanique.

EXP. VI. bis. B. — 8 février 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,9 à 41°,4, 68 heures après l'opération. Le fil de soie est retiré au bout de 19 heures. Les spores ne se sont pas développées. Le lapin est atteint d'infection pyocyanique. Atrophie de l'œil au 14^e jour. L'animal a eu longtemps de la fièvre; s'est complètement rétabli vers la fin de la 3^e semaine.

EXP. VII. C. — 2 février 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,6, après 48 heures. Le fil de soie est retiré au bout de 18 heures. Les spores ne se sont pas développées. (Le fil mis dans du bouillon à une température de 33° donne lieu, au bout de 20 heures, à un développement abondant de bactéridies.) La réaction du côté de l'œil est très violente, et l'animal perd son œil au 7^e jour. Fièvre assez prolongée; rétablissement complet au bout de 3 semaines.

ANNEXE N° 4.

Introduction, dans la circulation, de cultures du bacille du charbon et du pus bleu.

On poussait dans une veine de l'oreille, et immédiatement l'une après l'autre, 2 injections de 1^{cc} de chacune des cultures.

EXP. LX. — 16 mai 90. Lapin mort le 4^e jour. La température monte de 40° à 41°,9, après 53 heures. A l'autopsie : substance corticale des reins farcie de petits foyers purulents; le parenchyme est fortement hyperémié. La rate est légèrement hypertrophiée. Les autres organes ne présentent pas de modifications particulières. Sur les préparations faites avec les organes frais et colorés au bleu de méthyle, on trouve : dans les reins, une quantité considérable de bacilles pyocyaniques et peu de bactéridies, et par contre, dans la rate, peu de bacilles pyocyaniques et une quantité énorme de bact-

ridies. Même chose dans les cultures : l'ensemencement de la rate donne naissance à un grand nombre de bactériidies et à une quantité minime de bacilles pyocyaniques ; celui des reins à un grand nombre de bacilles pyocyaniques, et à un nombre restreint de bactériidies.

EXP. LXI. — 16 mai 90. Lapin mort en 48 heures. La température monte de 39°,8 à 41°,3, 20 heures après l'opération. A l'autopsie, on trouve dans les organes des lésions identiques à celles notées dans l'expérience précédente. Seulement l'ensemencement des reins donne lieu au développement exclusif des cultures du bacille pyocyanique.

EXP. LXII. — 16 mai 90. Lapin mort le 5^e jour. La température monte de 39°,9 à 42°,6, 72 heures après l'opération. Perte de poids de 450 grammes. A l'autopsie : les lésions macroscopiques sont les mêmes que dans les expériences précédentes. La distribution respective des deux espèces de bacilles et les résultats de l'ensemencement des organes sont également les mêmes.

EXP. LXIII. — 16 mai 90. Lapin mort le 4^e jour. La température monte de 39°,9 à 42°,9, 68 heures après l'opération. On peut supposer que l'infection mixte, par l'introduction directe de bactéries dans le système circulatoire, est capable de provoquer chez les animaux des températures très élevées, persistant jusqu'à la mort. Le lapin a perdu 430 grammes de son poids. Les modifications anatomo-pathologiques des organes sont les mêmes que dans les expériences précédentes. L'ensemencement et les cultures ont également donné les mêmes résultats que précédemment.

ANNEXE N° 5.

Introduction simultanée, dans la chambre antérieure de l'œil, de cultures de charbon, ou de spores, ou de sang charbonneux, et de cultures stérilisées du bacille pyocyanique.

Dans les 3 expériences qui suivent, on introduisait successivement dans la chambre de l'œil quelques gouttes de la culture stérilisée et de la culture du charbon, après avoir enlevé au préalable un peu d'humeur aqueuse. L'infiltration augmentait rapidement, et au bout de 20 heures, il était impossible de distinguer la pupille.

EXP. XXI. — 8 avril 90. Lapin mort le 5^e jour. La température monte de 39°,8 à 41°,6, 90 heures après l'opération. Accélération de la respiration au 4^e jour. Perte de poids de 460 grammes. A l'autopsie : hypertrophie de la rate, la pulpe splénique est friable, de couleur rouge, bleu foncé. Les autres organes ne présentent pas de modifications appréciables. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve une quantité de bactériidies dans tous les organes, principalement dans la rate.

EXP. XXII. — 8 avril 90. Lapin mort le 5^e jour. La température monte de 39°,9 à 41°,5, après 96 heures. Perte de poids de 450 grammes. Appétit

conservé jusqu'à la mort de l'animal. Accélération de la respiration au 3^e jour. A l'autopsie, on trouve dans les organes internes les mêmes lésions que dans l'expérience précédente. Sur les préparations microscopiques on constate la présence d'une quantité considérable de bactériidies dans tous les organes.

EXP. IV. — 2 février 90. Lapin mort le 6^e jour. La température monte de 39°,7 à 42°,7, 90 heures après l'opération. Accélération de la respiration au 4^e jour. Perte de poids de 150 grammes. A l'autopsie : rate hypertrophiée, de couleur rouge bleu foncé. Les autres organes ne présentent pas de modifications apparentes. Sur les préparations microscopiques, on trouve des bactériidies dans tous les organes.

Dans les expériences qui suivent on introduisait, au moyen d'une pince fine, par l'orifice qui avait servi à extraire un peu d'humeur aqueuse et à faire pénétrer la culture stérilisée du bacille pyocyanique, un fil de soie chargé de spores charbonneuses.

EXP. XLIX. — 23 avril 90. Lapin mort le 6^e jour. La température monte de 40° à 41°,9 après 48 heures. Le fil est retiré après 9 heures; développement abondant de bactériidies. On introduit encore dans l'œil quelques gouttes stérilisées de culture du bacille pyocyanique. Au 3^e jour, respiration fréquente. Perte de poids de 300 grammes. A l'autopsie, lésions caractéristiques du charbon, et bactériidies dans tous les organes.

EXP. L. — 23 avril 90. Lapin mort le 8^e jour. La température monte de 40° à 42° après 46 heures. Au bout de 6 heures, on retire de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure et on constate dans le liquide le développement des bactériidies. Le fil est laissé dans l'œil jusqu'au 4^e jour; on introduisait tous les jours dans la chambre antérieure quelques gouttes de cultures stérilisées de pus bleu. Phénomènes marqués non seulement du côté de l'œil, mais aussi du côté du tissu de l'orbite. Exophtalmie. Perte de poids de 390 grammes. A l'autopsie, tous les organes présentent des lésions parenchymateuses; sur les préparations microscopiques, on trouve des bactériidies dans tous les organes. Un cobaye auquel on introduit sous la peau le fil de soie retiré de l'œil, succombe au charbon au bout de 36 heures.

Dans les expériences qui suivent, l'introduction des spores a suivi de 24 à 48 heures des injections répétées (2 à 3 fois, avec des intervalles) des cultures stérilisées de bacilles pyocyaniques.

EXP. LVII. — 3 mai 90. Lapin mort le 5^e jour. La température monte de 39°,8 à 41°,3, 54 heures après l'opération. Le fil de soie est retiré au bout de 10 heures. Les spores du charbon se sont transformées en bactériidies. L'animal a perdu 250 grammes de son poids. La chambre antérieure est fortement infiltrée. A l'autopsie : rate hypertrophiée, rouge bleu foncé, friable; dans les organes et le sang, un grand nombre de bactériidies.

EXP. LVIII. — 12 mai 90. Lapin mort le 3^e jour. La température monte de 40° à 41°,6, après 116 heures. Le fil chargé de spores est introduit au

bout de 24 heures. Dans l'humeur aqueuse retirée au bout de 12 heures, on trouve un développement de bactériidies. On laisse le fil de soie. Perte de poids de 300 grammes. Accélération de la respiration au 4^e jour. A l'autopsie : modifications parenchymateuses dans les organes; les préparations colorées montrent l'existence des bactériidies dans tous les organes.

Exp. LIX. — 12 mai 90. Lapin mort le 3^e jour. La température monte de 39°,9 à 41°,3, 68 heures après l'opération. Le fil chargé de spores est introduit au bout de 48 heures, quand, sous l'influence de l'injection préalable de culture stérilisée de pus bleu, l'infiltration de la chambre antérieure était déjà très prononcée. Dans l'humeur aqueuse retirée au bout de 10 heures, on trouve déjà un développement des bactériidies charbonneuses. Perte de poids de 290 grammes. A l'autopsie : rate hypertrophiée, friable, rouge bleu foncé. Sur les préparations colorées on trouve des bacilles du charbon dans tous les organes.

Dans les expériences qui suivent, le lapin ayant reçu, dans l'œil, de la culture stérilisée du bacille pyocyanique pendant deux jours, au bout desquels l'infiltration de la chambre antérieure devient très prononcée, on introduit, dans le même œil, un peu de sang d'un cobaye mort du charbon en 24 heures.

Exp. LXIX. — 2 juin 90. Lapin mort le 3^e jour. La température monte de 40° à 42° après 70 heures. A l'autopsie, manifestations caractéristiques du charbon et bactériidies dans tous les organes.

Exp. LXX. — 2 juin 90. Lapin mort en 52 heures. La température monte de 40° à 42° après 79 heures. Dans l'humeur aqueuse, retirée 24 heures après l'introduction du sang charbonneux, on trouve des bactériidies très longues. Accélération considérable de la respiration le second jour. Perte de poids de 133 grammes. A l'autopsie, mêmes constatations que ci-dessus.

ANNEXE N° 6.

Introduction simultanée sous la peau de l'abdomen des animaux, et par la même ouverture, d'une culture stérilisée de bacille pyocyanique d'abord, d'une culture charbonneuse ensuite.

Exp. XXIII. — 8 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41° après 90 heures. Au 3^e jour, infiltration peu marquée du tissu cellulaire, qui disparaît au 7^e jour. Les cultures étaient âgées de 3 jours.

Exp. XXIV. — 8 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,9 à 40°,9, 86 heures après l'opération. Mêmes constatations que ci-dessus. Les cultures avaient 4 jours.

Exp. XXXVII. — 8 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,8, 24 heures après l'opération. Cultures de 4 jours; 1^{re} de chacune. Mêmes constatations que ci-dessus.

Exp. XXXVIII. — 18 avril 90. Lapin mort d'une maladie inconnue. La température monte de 40° à 41°,3, après 18 heures. L'animal avait reçu 1^{cc},5 de chacune des deux cultures. Vers la fin de la 1^{re} semaine, l'infiltration disparaissait et l'animal semblait rétabli quand, repris le 21^e jour de convulsions cloniques généralisées, il meurt le 23^e jour. Péritoine injecté. L'exsudat, ensemencé sur gélose, donne le *staphylococcus albus*. Rien dans le foie, les reins ni la rate. Cœur dilaté, fibre cardiaque friable.

Exp. LI. — 2 mai 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,s après 48 heures. L'animal avait reçu 2^{cc} de chaque culture. Infiltration légère qui disparaît le 10^e jour.

Exp. LII. — 8 mai 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,3, après 52 heures. L'animal reçoit 3^{cc} de chaque culture. Pas d'infiltration, rétablissement rapide.

ANNEXE N° 7.

Introduction sous la peau, à petite distance l'une de l'autre, de la culture stérilisée du charbon et de la culture de pus bleu virulente.

On injecte d'abord 1^{cc} de culture charbonneuse dans du bouillon, puis, à 10 ou 15 millimètres du point d'injection, on fait 12 injections de 0^{cc},5 de culture stérilisée de bacille pyocyanique.

Exp. XXV. — 9 avril 90. Lapin mort le 4^e jour. La température monte de 39°,9 à 41°,3, après 42 heures. Au 3^e jour, infiltration du tissu cellulaire sous-cutané au niveau des inoculations. A l'autopsie : rate hypertrophiée, rouge bleu foncé. Pas de modifications dans les autres organes. Sur les préparations colorées et faites avec les organes frais, on trouve des bactériidies charbonneuses dans tous les organes.

Exp. XXVI. — 9 avril 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 41°,2 après 24 heures. Le lapin recevait à chaque injection 1^{cc} de culture stérilisée de pus bleu, en tout 9^{cc}. L'infiltration qui s'est manifestée au 3^e jour disparaît complètement vers la fin de la 1^{re} semaine. Rétablissement complet vers le commencement de la troisième.

Exp. XXXI. — 15 avril 90. Lapin mort au bout de 3 semaines. La température monte de 33°,9 à 40°,3, au bout de 30 heures. On introduit en tout 8^{cc} de pus bleu en 4 fois; dans le cours de la première semaine, quand la température de l'animal est redevenue normale, on a cessé les injections. Au 16^e jour, apparition sous la peau de la région du nez d'une infiltration se transformant ensuite en un abcès. L'ensemencement du pus de l'abcès donne lieu au développement de colonies de staphylocoque. A l'autopsie : foie et rate hypertrophiés, de couleur rouge bleu foncé. Sur les préparations

faites avec les organes, on trouve des bactériidies charbonneuses, seulement elles sont fortement dégénérées. L'ensemencement donne lieu au développement simultané des bactériidies et des staphylocoques (*staphylococcus albus*).

EXP. XXXII. — 2 mai 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40°,1 à 41°,2, 48 heures après l'opération. On a introduit en tout 8^{cc} de culture stérilisée de pus bleu, en 8 jours. Infiltration insignifiante dans la région où ont été faites les inoculations. L'infiltration ne tarde pas à disparaître au bout de 6 jours, et l'animal se rétablit complètement au bout de quelque temps.

EXP. LIII. — 2 juin 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 39°,9 à 42°,1, après 46 heures. On a introduit en tout 12^{cc} de culture stérilisée de pus bleu en 4 jours. L'infiltration ne se développe pas aux points d'inoculation. Au 12^e jour la température redevient normale. L'animal a perdu pendant ce temps 120 grammes de son poids, mais n'a pas tardé à se rétablir complètement.

EXP. LIV. — 2 juin 90. Lapin qui a survécu. La température monte de 40° à 42°, 52 heures après l'opération. Expérience conduite de la même façon que précédemment. La température redevient normale au 15^e jour. Pendant ce temps, l'animal a perdu 230 grammes de son poids, mais les a ensuite regagnés au bout de 10 jours.

EXPÉRIENCE DE CONTROLE pour les expériences 31, 32, 53 et 54. — 2 juin 90. Lapin n'ayant reçu que l'injection charbonneuse, mort le 14^e jour. Sa température monte de 40° à 42°,2, le 9^e jour. OEdème sous-cutané augmentant tous les jours; perte de poids : 450 grammes; à l'autopsie, rate hypertrophiée, friable, rouge bleu foncé; rien d'apparent dans les autres organes. Bactériidies partout.

ANNEXE N° 8.

Introduction successive d'une culture stérilisée du bacille pyocyanique dans du bouillon, poussée par une veine de l'oreille, et d'une culture de charbon sur gélose poussée sous la peau.

EXP. LXIV. — 23 mai 90. Lapin mort le 8^e jour après le début de l'expérience, et 75 heures après l'infection charbonneuse. La température monte de 39°,8 à 41°,9, 2 heures après l'injection. L'animal a reçu pendant 6 jours, avec des intervalles, des injections dans la veine de l'oreille de 2^{cc} de culture fraîche, stérilisée, de pus bleu. On en a injecté en tout 8^{cc}. 6 heures après la dernière injection, on introduit sous la peau la valeur de ce que tient l'anse de platine, de culture de charbon sur gélose. Le lapin succombe au bout de 75 heures. A l'autopsie: rate hypertrophiée rouge bleu foncé; lésions parenchymateuses dans la rate. Les autres

organes ne présentent pas de modifications apparentes. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve des bactériidies dans tous les organes. En 5 jours l'animal a perdu 260 grammes de son poids.

EXP. LXV. — 23 mai 90. Lapin mort le 12^e jour après le début de l'expérience et 5 jours après l'injection charbonneuse. La température monte de 39°,6 à 44°,6, 4^h 30^m après l'injection. On a injecté en tout 10^{cc} de culture stérilisée de pus bleu. Après la dernière injection, quand la température est redevenue normale, on introduit sous la peau la valeur de l'anse de platine, de charbon sur gélose. Au 3^e jour infiltration manifeste au point d'inoculation. Accélération de la respiration au 4^e jour. Perte de poids de 300 grammes. A l'autopsie : hypertrophie considérable de la rate, qui est friable; hyperémie des reins; le cœur est notablement distendu par du sang noir. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve des bactériidies dans tous les organes.

EXP. LXVI. — 24 mai 90. Lapin mort le 14^e jour après le début de l'expérience et le 8^e jour après l'infection charbonneuse. La température monte de 40° à 41°,7, 1 heure et demie après l'injection. On introduisait tous les deux jours dans la veine de l'oreille 4^{cc} de culture stérilisée de pus bleu. On a injecté en tout 16^{cc}. Après la dernière injection, on introduit sous la peau la valeur d'une grande anse de platine, de culture de charbon sur gélose. Pas d'infiltration au point d'inoculation. Perte de poids de 320 grammes. Au 5^e jour après l'infection par le charbon, la respiration devient accélérée. A l'autopsie : rate hypertrophiée, rouge bleu foncé; hyperémie des reins et du foie. La fibre cardiaque est friable. Sur les préparations microscopiques, on trouve des bactériidies dans tous les organes.

EXP. LXVII. — 24 mai 90. Lapin mort le 7^e jour après le début de l'expérience et 73 heures après l'infection charbonneuse. La température monte de 40° à 41°,3, 1 heure et demie après l'injection. Introduction tous les deux jours, dans la veine de l'oreille, de 4^{cc} de culture stérilisée de pus bleu. Injecté en tout 16^{cc}. Après la dernière injection, on introduit sous la peau la valeur de deux anses de platine de culture sur gélose de charbon (âgée de 3 jours). Au 2^e jour, accélération de la respiration. Perte de poids de 630 grammes. A l'autopsie, les organes internes présentent les mêmes modifications que dans l'expérience précédente. Sur les préparations faites avec les organes frais, on trouve des bacilles dans tous les organes.

EXPÉRIENCE DE CONTROLE pour les expériences 64, 65, 66 et 67. — 23 mai 90. Lapin mort le 7^e jour après l'introduction sous la peau d'une anse de platine d'une culture de charbon, faite sur gélose, et âgée de 3 jours. La température monte de 39°,9 à 42°,8, 20 heures après l'opération. Au 3^e jour infiltration au point d'inoculation. Respiration accélérée. Perte de poids de 250 grammes. A l'autopsie : rate fortement hypertrophiée, de couleur rouge bleu foncé. Les autres organes ne présentent pas de modifications apparentes. Sur les préparations microscopiques faites avec les organes, on trouve des bactériidies dans tous les organes.

APPENDICE N° 10.

Influence qu'ont, sur le développement des spores charbonneuses, des cultures du bacille pyocyanique faites sur bouillon, stérilisées et placées, en gouttes pendantes, dans la chambre humide (mars et avril 90).

+ Développement normal des spores en bactériidies; 0, développement faible; —, absence de développement; o —, développement faible dans certaines gouttes, nul dans d'autres. Les spores étaient portées par un fil de soie. Les cultures étaient stérilisées pendant 10 minutes à 115°.

N° DE L'EXP.	AGE DE LA CULTURE DU BAC. PYOCYAN.	TEMPÉRATURE DU THERMOSTAT	TEMPS DU SÉJOUR DANS LE THERMOSTAT	RÉSULTATS
1	12 heures.	33°	42 heures.	+
2	18 »	»	30 »	0 —
3	24 »	»	24 »	—
4	48 »	»	32 »	—
5	72 »	34°	26 »	—
6	4 jours.	»	30 »	—
7	6 »	33°	34 »	—
8	7 »	»	24 »	—
9	10 »	»	28 »	—
10	15 »	»	24 »	—
11	21 »	»	30 »	—
			48 »	0 —
12	30 »	»	26 »	—
			46 »	0 —
13	5 semaines.	»	24 »	0 —
			» »	0
14	6 »	»	30 »	0 —
			48 »	0

ORIGINE TELLURIQUE DU POISON DES FLÈCHES

DES NATURELS DES NOUVELLES-HÉBRIDES (Océanie)

PAR M. LE D^r LEDANTEC, MÉDECIN DE 1^{re} CLASSE DE LA MARINE.

Les naturels des Nouvelles-Hébrides, qui sont encore à l'occasion anthropophages, se servent de deux espèces de flèches : les flèches de chasse et les flèches de guerre.

Les flèches de chasse se composent de deux parties : une tige qui n'est autre chose qu'un roseau de longueur variable, et une pointe habituellement en bois dur ; quelquefois, c'est une arête de poisson ou un piquant d'oursin ;

Les flèches de guerre se composent de trois parties :

1^o Une tige de roseau ;

2^o Une partie moyenne en bois dur ;

3^o Une troisième partie surajoutée qui est habituellement un morceau d'os humain (cubitus ou péroné) soigneusement usé, de manière à former une pointe délicate. Cette pointe osseuse se brise à un choc un peu violent ; elle est recouverte d'un enduit noirâtre ressemblant assez bien à des amas de grains de poudre qui auraient été mouillés puis desséchés. Ces grains noirâtres constituent le poison des flèches.

La longueur moyenne des flèches, qu'elles soient destinées à la chasse ou à la guerre, est d'environ trois pieds.

On a toujours émis des doutes sur l'existence du poison dans les flèches empoisonnées par les naturels du Pacifique. Cependant, les relations de voyage des navigateurs notent que les blessures sont habituellement suivies de tétanos.

En 1864, dans la baie de Granova, l'évêque Patteson fut attaqué par les indigènes ; un Anglais et deux indigènes au

service de l'évêque furent blessés ; le premier guérit sans accident, les deux autres moururent du tétanos.

Dans une deuxième attaque, l'évêque Patteson fut massacré à Nuka ; trois de ses hommes furent blessés, un blanc et deux indigènes. Le blanc et un indigène moururent du tétanos.

Un navire de guerre anglais, le *Rosario*, eut, quelque temps après, deux hommes blessés, l'un à l'aîne et à la poitrine, l'autre à l'avant-bras ; le premier guérit, le second mourut du tétanos le onzième jour.

Le fait le plus connu est le cas de la frégate *La Pearl*, portant e guidon du commodore Goodenough. Le 12 août 1875, *La Pearl* mouillait dans la baie de Carlisle devant l'île de Santa-Cruz, la plus considérable des îles du groupe de ce nom, auquel appartient Vanikoro où périt La Pérouse. Le commodore descendit à terre avec trois embarcations. Après quelques échanges, Goodenough, plein du souvenir des attaques dont ses compatriotes avaient été victimes, et s'apercevant que les indigènes voulaient l'entraîner dans l'intérieur, donna l'ordre de rallier les embarcations. Cet ordre s'exécutait à peine que les Anglais furent assaillis par une bordée de flèches. Le commodore, un officier et cinq hommes furent atteints. Aucune des blessures n'était grave en elle-même. Le sixième jour éclatèrent à bord les premiers symptômes de tétanos. Le 20 août, par conséquent le neuvième jour, le commodore et un des marins moururent. Un autre jeune marin, blessé à la tête, mourut le 21, après avoir présenté du trismus et des convulsions généralisées. Les autres blessés guérirent promptement ¹.

C'est en lisant ces faits, pendant notre dernière campagne, que, soupçonnant l'origine tellurique du poison, nous eûmes l'idée de faire quelques recherches au laboratoire de Nouméa. Diverses tentatives d'inoculation avaient déjà été faites, mais toujours sans succès (1^o Forster, récit des voyages de Cook ; 2^o Halford, professeur d'une université d'Australie ; 3^o Commis-

[1. Le commodore Goodenough est ce même officier anglais qui, accompagné de sa femme, parcourut, en 1870, les champs de bataille de Sedan et de Metz pour distribuer des secours à nos malheureux compatriotes. Les derniers moments de cet homme de bien ont été admirables de fermeté. Il se fit monter sur le pont et fit ses adieux à son équipage en leur donnant les plus nobles conseils.

(*Memor and Journal of Commodore Goodenough, edited by his widow.* London 1876)
Arch. de Méd. nav., 1877. Variétés.

sion présidée par le docteur Brassac, en 1882, à Nouméa). Nous-mêmes, nous avons eu des déceptions au début. Ces insuccès s'expliquent soit par le peu de réceptivité des animaux employés (chiens), vis-à-vis du tétanos, soit par l'atténuation de virulence des vieilles flèches, quand on opérait sur des lapins et des rats.

Voici comment nous avons opéré : nous avons pratiqué, en suivant tous les préceptes de l'antisepsie, une petite poche dans la peau du dos ou du ventre de l'animal en expérience, et nous avons introduit dans cette poche le poison préalablement pulvérisé dans un mortier stérilisé; puis nous avons réuni les lèvres de la plaie par quelques points de suture. Les flèches étaient vieilles et provenaient de trois sources différentes.

1^o FLÈCHES DE LA 1^{re} SÉRIE. — 1 souris, 1 cobaye adulte, 1 lapin.

Le seul accident à noter a été un abcès chez le cobaye au point d'inoculation.

2^o FLÈCHES DE LA 2^e SÉRIE. — 1 souris, 2 lapins.

Un des lapins a présenté, 3 jours après l'inoculation, une contracture du membre postérieur droit, contracture qui a duré 3 jours au bout desquels tout est rentré dans l'état normal.

3^o FLÈCHES DE LA 3^e SÉRIE. — Petits cobayes, inoculés le 18 mars à 4 heures du soir.

Cobaye n^o 1. — Inoculé à la région dorsale.

— n^o 2. — — — abdominale.

— n^o 3. — — — abdominale.

Cobaye n^o 1. — 19 mars : néant.

20 mars, matin : contracture en extension du membre postérieur droit.

20 mars, soir : même état.

21 mars, matin : opisthotonos. Secousses violentes, strabisme divergent, léger tremblement des pattes alternant avec les secousses tétaniques, trismus, écume à la bouche et aux narines. — Mort à 5 heures du soir.

Cobaye n^o 2. — 19 mars : néant.

20 mars, soir : contracture en extension des membres postérieurs.

21 mars, matin : rigidité du train postérieur; l'animal est obligé de sauter pour avancer; contraction des muscles de la région dorsale. A 9 heures du matin, rigidité généralisée, opisthotonos, secousses violentes succédant à de courts moments de résolution musculaire, tremblement des pattes pendant le relâchement. — Dyspnée, anxiété, strabisme convergent, écume à la bouche et aux narines. Trismus. — Mort à 9 heures 1/4.

Cobaye n° 3. — 19 mars : néant.

20 mars, soir : rigidité du train postérieur.

21 mars, matin : l'animal saute en voulant marcher.

9 heures, matin : écume à la bouche et aux narines ; contracture en extension des membres antérieurs ; emprostotonos ; légère contracture en flexion des membres supérieurs.

11 heures : strabisme convergent, tremblement des pattes alternant avec les secousses.

Midi 1/2 : rigidité générale, dyspnée, trismus.

Mort à 1 heure 1/2.

Notons en passant que le cobaye inoculé à la région dorsale a eu du strabisme divergent, et que les deux cobayes inoculés à la région abdominale ont eu du strabisme convergent.

Depuis que nous avons fait ces expériences, des recherches ont été faites en France sur le tétanos.

Il ressort de ces expériences que le cobaye est le réactif le plus sensible pour le bacille tétanique et que toutes les fois qu'on soupçonne la virulence d'être diminuée, le cobaye doit être l'animal de choix. Ainsi, le bacille de Nicolaïer est moins actif dans les vieilles flèches. Ceci explique pourquoi les blessures par flèches empoisonnées ne sont pas fatalement suivies de tétanos.

Pendant que nous faisons ces expériences à Nouméa, nous avons eu la bonne fortune d'avoir à notre service un Canaque Néo-Hébridais, originaire de l'île Pentecôte. Il nous a exposé la façon dont ses compatriotes fabriquaient des flèches empoisonnées. Il en avait fabriqué lui-même pendant la guerre de tribu à tribu. Nous relatons cette opération en respectant les moindres détails : On commence par faire, au moyen d'une pierre¹, une incision à un arbre appelé *Dot*. Cette incision laisse échapper un suc laiteux qu'on laisse prendre de la consistance sur l'arbre même. On enduit la pointe de la flèche de guerre, c'est-à-dire l'os humain effilé, de ce suc devenu visqueux à l'air. Ce suc ne sert qu'à fixer le poison véritable. On enroule sur cet enduit un fil, en laissant un certain espace entre les spirales. Cela fait, au moyen d'une écuelle de noix de coco, on prend de l'humus au fond des trous des crabes dans les marais à palétuviers,

1. Le fer n'était pas connu avant l'arrivée des Européens. Les Canaques étaient encore à l'âge de la pierre polie.

marais très malsains qui bordent la côte. On plonge dans cet humeur l'extrémité de la flèche préparée. On fait sécher au soleil et, après dessiccation, on enlève le fil. L'enlèvement de ce fil fait tomber quelques parcelles de terre, et a probablement pour but de produire des aspérités à la surface de la pointe empoisonnée.

TRAITEMENT. D'après les expériences de Kitasato, des fils de soie imprégnés de bacilles pourvus de spores résistent pendant 15 heures à l'action d'une solution d'acide phénique à 5 0/0, mais, si l'on ajoute 0,5 0/0 d'acide chlorhydrique, les spores sont détruites en 2 heures. La solution de sublimé à $\frac{1}{1000}$ additionnée de 0,5 0/0 d'acide chlorhydrique tue les spores en 30 secondes. Kitasato a pu arrêter le développement du tétanos en incisant la partie inoculée moins d'une heure après l'inoculation.

Ces expériences doivent nous servir de base pour le traitement des plaies par flèches empoisonnées. Faisons d'abord remarquer qu'au point de vue des lésions anatomiques, les plaies par flèches sont rarement graves; la pointe osseuse se brise dès qu'elle rencontre un plan résistant, et nous croyons que le but des indigènes, en plaçant un corps fragile à l'extrémité de leurs flèches, était d'introduire un corps étranger dans la plaie pour permettre au poison de produire plus sûrement ses effets. La plaie peut donc être compliquée de la présence de la pointe osseuse, mais elle est toujours compliquée de la présence de fragments de terre noirâtre qui se logent dans les anfractuosités et qui seront très difficiles à enlever à cause du faible diamètre du trajet fistuleux. Dans ces conditions, nous conseillons de débriider largement de manière à pouvoir faire une toilette minutieuse des tissus dilacérés. Irriguer ensuite la plaie pendant plusieurs minutes et plusieurs fois par jour au moyen de la solution :

Bichlorure de mercure.	1gr.
Acide chlorhydrique	0gr.50
Eau	1000gr.

Enfin, bourrer le trajet fistuleux de poudre d'iodoforme. Si la plaie était pénétrante et surtout si un fragment d'os était logé dans la cavité abdominale, il serait indiqué de faire la laparatomie.

Tel est le traitement local; quant au traitement général, il a son importance. Les équipages qui fréquentent ces régions connaissent, par ouï-dire, les effets des flèches empoisonnées,

témoin la terreur occasionnée chez les blessés de *La Pearl* par les récits d'un homme de l'équipage,

Le commodore Goodenough lui-même, officier d'une rare énergie, écrivait cinq jours après l'agression dont il avait été victime : « Nous sommes au mardi, il y a juste cinq jours, il me semblé que c'était hier. Dans cinq jours, nous pourrons dire que tout danger d'empoisonnement est passé; mais dès le premier moment, j'ai tenu fermement la possibilité de cette éventualité devant mes yeux. Il est bon d'être amené à regarder une mort prochaine comme plus probable encore qu'à l'ordinaire. »

Une pareille inquiétude finit par devenir une obsession et empêche toute espèce de repos. Cette insomnie perpétuelle, cette fatigue du cerveau est une sorte de surmenage qui doit mettre les blessés en un état de réceptivité bien propre à favoriser l'éclosion du tétanos. Il est donc indiqué de rassurer les blessés, de relever leur moral. On prescrira de fortes doses de chloral, 6 à 8 grammes et plus. Ce médicament, en dehors de son action soporifique, a encore l'avantage d'avoir donné quelques guérisons dans le cas de tétanos déclaré.

CONCLUSIONS. Les naturels des Nouvelles-Hébrides, et probablement ceux des îles Santa-Cruz et des îles Salomon, empoisonnent leurs flèches avec de la terre des marais. Cette terre doit contenir le vibrion septique et le bacille du tétanos. La dessiccation au soleil tue rapidement le vibrion septique. Il ne reste donc que le microbe de Nicolaïer qui, grâce à ses spores, peut résister des mois et peut-être même des années. Le poison s'atténuant de plus en plus, les vieilles flèches finissent par devenir inoffensives. Cette diminution progressive de virulence caractérise les flèches de cette partie de l'Océanie. En Amérique et en Afrique, où les peuplades sauvages se servent de poison végétal ou du venin des serpents, on ne constate rien de semblable. Les indications thérapeutiques qui découlent de ces diverses notions, et principalement l'antisepsie par le bichlorure acidulé par l'acide chlorhydrique, peuvent être précieuses pour les médecins des deux marines anglaise et française en station ou en résidence aux Nouvelles-Hébrides¹.

1. Les Nouvelles-Hébrides, que nous avons occupées, puis évacuées, il y a trois ans, sont placées sous le protectorat de la France et de l'Angleterre.

EXPÉRIENCES

SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES VÉGÉTAUX

PAR M. EM. LAURENT.

(Travail fait au laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne.)

Beaucoup de bactéries sont capables de réduire les nitrates, soit directement, en leur empruntant l'oxygène dont elles ont besoin, soit indirectement en faisant du liquide où elles vivent un milieu réducteur dans lequel les nitrates se décomposent. Tout le monde connaît les fermentations nitreuses qui surviennent quelquefois dans les sucreries, et dans lesquelles une cuve de cossettes de betteraves dégage des torrents de bioxyde d'azote. On a même considéré ces phénomènes de réduction comme une fonction particulière des bactéries.

Il n'en est pourtant rien, car j'ai trouvé que le pouvoir de réduire les nitrates est général parmi les végétaux. J'ai vu en outre que cette réduction peut aussi se faire sous l'influence exclusive de la radiation solaire¹. Il en est donc de cette transformation chimique comme de bien d'autres, qui, comme l'a montré M. Duclaux², dépendent plus de la stabilité de la molécule attaquée que du genre d'attaque qu'elle subit.

I

RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES GRAINES EN GERMINATION.

Schönbein³ avait signalé autrefois la réduction des nitrates par les graines; mais tout fait supposer que ce savant avait

1. *Bull. de l'Ac. de Belgique*, 3^e S., t. XX, p. 303, 1890. Des solutions de nitrate de potassium, de sodium et de calcium, exposées à une radiation même peu intense, ne tardent pas à présenter la réaction des nitrites. Il se dégage en même temps un peu d'oxygène. Le phénomène s'accomplit dans le vide comme dans l'air. Même à l'état solide, les nitrates sont réduits, il est vrai en proportion minime.

Des expériences d'insolation sous des écrans constitués avec des solutions d'alun, de bichromate de potassium, de sulfate de cuivre et de sulfate de quinine m'ont appris que ce sont les rayons les plus réfrangibles du spectre qui agissent en cette circonstance.

2. *Ann. de l'Institut Agronomique*, t. X, 1886.

3. *Journal für praktische Chemie*, Bd. CV, p. 214, 1868.

observé des actions réductrices provoquées, non par les graines plongées dans les solutions nitriques, mais par les bactéries qui s'étaient multipliées dans ces solutions, grâce aux matières organiques diffusées au travers des téguments des semences.

La grande difficulté dans ces recherches est, en effet, de se mettre à l'abri des causes d'erreur qui peuvent résulter du développement de bactéries dans les liquides contenant les graines mises en expérience.

Voici comment j'y suis arrivé. Les graines destinées aux essais ont été d'abord plongées pendant un quart d'heure dans une solution de bichlorure de mercure à 1/1000. Il vaut mieux faire cette opération dans de larges tubes à essais, bouchés avec de l'ouate et, au préalable, stérilisés à 180°; on agite assez fortement le contenu pour faciliter la disparition des bulles d'air qui restent adhérentes aux téguments, surtout dans les anfractuosités de la surface, et qui pourraient soustraire des germes à l'influence du sublimé.

Lorsque l'immersion est suffisante, le liquide est décanté et les graines lavées soigneusement et à trois reprises avec de l'eau stérilisée à 120°; on peut même l'employer bouillante à la condition de ne pas prolonger la durée des lavages. Au dernier lavage, on laisse au fond du tube une petite quantité d'eau, suffisante pour permettre la germination des graines. Celle-ci est très rapide si l'on a soin de placer les tubes à une température voisine de l'optimum, dans une position presque horizontale, de façon à ce que chaque semence soit en contact avec une petite réserve d'eau sans être complètement immergée.

Dès que le développement des plantules est assez avancé, on introduit, à l'aide d'un matras-pipette, une quantité de la solution de nitrate suffisante pour recouvrir complètement les graines lorsque les tubes sont placés debout. Cette manipulation est assez délicate, mais elle réussit presque toujours. Au reste, on est averti de son insuccès par le trouble de la solution, lorsque des germes y ont pénétré et s'y sont multipliés.

La concentration des solutions de nitrate ne doit jamais être assez forte pour déterminer la plasmolyse des cellules végétales. Je me suis servi presque toujours de solutions à 1 0/0.

Un point des plus importants est le choix de l'eau distillée à employer pour préparer ces solutions. C'est une vérité trop sou-

vent perdue de vue que les nitrites sont extrêmement répandus dans la nature et aussi dans les laboratoires. L'eau distillée exposée à l'air libre présente après un jour ou deux la réaction des nitrites. Il en est de même dans les laboratoires où l'on brûle beaucoup de gaz. Un essai préliminaire est indispensable pour éviter par la suite des erreurs d'observation. Il faut aussi conserver les solutions de nitrate préparées dans des matras bien bouchés, stérilisés à l'autoclave et placés à l'obscurité pour éviter l'action réductrice de la radiation solaire.

Toutes ces précautions étaient d'autant plus indispensables que j'employais, pour caractériser les nitrites, un réactif d'une sensibilité extrême : le chlorure de naphtylamine en présence d'acide chlorhydrique dilué et d'acide sulfanilique ; il donne aux solutions de nitrites une coloration rouge plus ou moins rapide, plus ou moins foncée suivant la proportion de nitrite qui existe dans le liquide soumis à l'essai. La coloration est persistante, avantage des plus précieux sur d'autres réactions du même genre. Cependant, dans les solutions assez concentrées (1/10000 1/1,000, 1/100), elle diminue et même disparaît si l'on n'a soin d'introduire une quantité suffisante de naphtylamine. D'habitude, j'opérais sur environ dix centimètres cubes de liquide, et j'y introduisais successivement trois gouttes d'acide sulfanilique à saturation, une goutte d'acide chlorhydrique dilué au 1/10, et enfin trois gouttes de chlorure de naphtylamine à saturation. Chaque goutte équivaut à environ un vingtième de centimètre cube. Il convient de ne pas mélanger les trois substances indiquées, ainsi que le font certains chimistes ; en effet, j'ai observé que certains sucs végétaux devenaient rouges sous l'action de l'acide chlorhydrique.

Traitée de la manière indiquée, de l'eau distillée très pure qui contient une partie de nitrite de potassium pour un milliard de parties d'eau, se colore en rose très pâle au bout d'une demi-heure.

Par des essais comparés, je me suis rendu compte du temps nécessaire à l'apparition de la coloration, et de l'intensité de celle-ci, dans des solutions de concentrations déterminées. Cela m'a permis de faire des évaluations approximatives sur l'activité réductrice des tissus végétaux.

L'extrême sensibilité de la naphtylamine en présence de l'acide nitreux et, d'un autre côté, l'existence fréquente de cet

acide dans les eaux distillées employées dans beaucoup de laboratoires, ont parfois fait infirmer la valeur de ce réactif. Il n'est pas bien difficile d'éviter toute cause d'erreur; au surplus, pour me couvrir de tout reproche, j'ai eu constamment soin de faire un essai à blanc avec l'eau distillée qui avait servi à préparer la solution nitrique. Les divers organes végétaux y étaient immergés côte à côte avec les essais dans les mélanges avec nitrates.

Voici le résumé de quelques expériences faites avec des graines de diverses espèces :

a. — Le 13 mai 1889, vingt-quatre graines de maïs sont introduites dans deux tubes de vingt-cinq centimètres de long sur deux de large, qui sont placés, après stérilisation, à l'étuve à 35°. Lorsque les tigelles ont atteint quatre à six centimètres de longueur, on les immerge dans environ trente centimètres cubes de nitrate de potassium à 1 0/0. Après un nouveau séjour de quarante-huit heures à 35°, les liquides des deux tubes donnent une coloration rouge très nette avec le chlorure de naphtylamine. La coloration est plus marquée dans le plus étroit des deux tubes, parce que, comme nous le verrons plus loin, la réduction des nitrates est plus active lorsque la surface du liquide en contact avec l'air est plus petite.

Immergées dans l'eau, les jeunes plantules de maïs n'ont pas tardé à périr, puis elles sont devenues noirâtres. Cette altération s'est faite de proche en proche à partir du niveau du liquide, ce qui fait supposer un phénomène d'oxydation dû à l'action de l'air extérieur. Les liquides sont restés limpides, preuve évidente de l'absence de germes de microbes vulgaires. Le 13 juin, la réaction des nitrites avait disparu. Je discuterai plus loin ce résultat.

b. — Le 28 mai, j'introduis une solution de nitrate de potassium à 1 0/0 dans deux longs tubes contenant chacun douze graines de lupin blanc en germination; ces tubes sont placés à la température de 22-24°. Après vingt-quatre heures, le liquide donne très nettement la réaction des nitrites dans les deux tubes. A partir du 1^{er} juin, la réaction devient peu apparente, et, le 4 de ce mois, elle ne peut plus être obtenue.

c. — Les graines de pois conviennent très bien aux expériences sur la réduction des nitrates. Maintes fois, j'en ai fait germer dans de longs tubes étroits à l'abri des microbes. Lorsque les racines avaient de 5 à 30 millimètres, j'introduisais dans les tubes la solution stérilisée de nitrate. Après une heure de séjour à 30°, la réaction des nitrites était bien marquée. Elle devenait de plus en plus accusée pendant les quatre ou cinq heures suivantes et diminuait d'intensité après quinze ou vingt heures. Au bout de deux ou trois jours, le nitrite avait totalement disparu. Ce moment arrive plus tôt lorsqu'on chauffe les graines immergées dans la solution qu'elles avaient commencé à réduire.

d. — Dans les graines de pois en germination, il est facile d'isoler les

cotylédons et les embryons. Vingt-cinq graines dont les radicules avaient en moyenne cinq millimètres de longueur, ont été traitées de cette façon : les cotylédons ont été introduits dans un tube avec la solution nitrique et les embryons dans un autre tube. Après trois heures de séjour à 24°, la réaction des nitrites était visible des deux côtés, mais, pour des poids égaux de matière vivante, le pouvoir réducteur des cotylédons était plus manifeste que celui des embryons.

Cependant, lorsque la jeune plante a acquis un certain développement, ses propriétés réductrices atteignent un degré plus élevé. Ainsi, j'ai vu des plantules dont les tiges avaient de deux à trois centimètres et les racines de sept à dix centimètres, produire des nitrites tout aussi activement que les cotylédons. Je répète que je tenais compte de la masse de tissus mis en expérience.

Aucune différence ne m'a paru exister entre le pouvoir réducteur des jeunes racines et celui des tiges.

e. — Lorsque l'on concasse grossièrement les graines en germination, cotylédons et axes végétatifs, le pouvoir réducteur persiste et ne semble même pas être diminué. Toutefois, si la trituration est plus complète, elle affaiblit d'une manière très appréciable le pouvoir réducteur des graines en germination.

f. — Quant aux graines en repos et à celles qui mûrissent dans leur gousse, elles ont été sans action réductrice sur la solution de nitrate de potassium. Il est remarquable que le pouvoir réducteur n'existe pas dans les graines en repos, mais qu'il se développe dès les premiers moments de la germination. L'essai suivant en est une preuve évidente. Trente graines de pois placées depuis vingt heures dans un peu d'eau, et dont la radicule commençait à poindre, donnèrent une légère réaction nitreuse après une heure de séjour à 6° dans la solution de nitrate. Vingt-quatre heures plus tard, cette réaction était beaucoup plus nette.

g. — Des essais de réduction ont donné des résultats similaires avec des graines d'orge, des cotylédons de fève et de haricot enlevés aux graines en germination. L'énergie réductrice de ces espèces est cependant moindre que celle des graines de pois.

J'ai observé que la réduction des nitrates a lieu également, mais est très faible, lorsque les graines d'orge en germination sont desséchées lentement, puis réduites en farine au moyen d'un moulin à café. L'intervention des bactéries était éliminée par le séjour des matériaux en expérience dans une glacière dont la température était de 5 à 7°. Sans doute, l'activité des cellules est fortement diminuée par suite de la dessiccation et de la trituration au contact de l'air.

Il est deux objections que plus d'un lecteur sera tenté de faire aux expériences que je viens d'exposer : on pourra arguer de l'existence dans les graines de petites quantités de nitrites, ou bien de substances quelconques capables de donner une coloration rose avec le réactif employé. J'ai eu soin de m'assurer

de l'absence de nitrites dans les graines étudiées. Quant à l'autre objection, des essais faits pour chaque espèce dans l'eau distillée m'ont convaincu qu'elle n'est nullement fondée.

Jusqu'ici je ne me suis occupé que des graines placées dans des tubes étroits et recouvertes d'une couche d'eau assez épaisse. Il est permis d'admettre que l'oxygène en dissolution dans le liquide est rapidement absorbé par les plantules, et que c'est à partir de ce moment que commence le phénomène de réduction. Si cette conception est exacte, il n'y aura pas production de nitrite au contact de l'air. Rien n'est plus facile à démontrer. Des graines de pois en germination, entières ou concassées, sont mises dans un vase à fond plat avec une très faible couche de solution de nitrate. Dans ces conditions, aucune trace de nitrite n'est constatée.

Il en est tout autrement lorsqu'on fait le vide dans le vase qui renferme les graines en expérience, ou encore si l'on remplace l'air par un gaz inerte. L'hydrogène convient mieux que l'anhydride carbonique, qui semble ralentir les actions réductrices provoquées par les tissus végétaux.

Des plantules de pois, plongées dans le vide et placées à la température de 15°, réduisent les nitrates avec une activité telle que l'on peut constater la présence de nitrite au bout d'une demi-heure. Dans les expériences faites avec les solutions dont l'air dissous n'a pas été éliminé, il faut au moins une heure pour que l'on puisse observer la présence de nitrite.

L'activité réductrice des graines peut être évaluée, au moins d'une manière assez approximative, par le dosage du nitrite qui se forme au sein de la solution de nitrate. En présence des nitrates, ce dosage ne peut pas être direct; on doit recourir aux méthodes colorimétriques. J'ai utilisé successivement la coloration donnée par une proportion connue de chlorure de naphthylamine, et la coloration de l'amidon en présence d'acide nitreux et d'iodure de potassium (méthode de M. Chabrier).

La première méthode n'est guère rigoureuse, mais avec un peu d'attention on peut en tirer un certain parti.

Quarante-cinq graines de pois en germination, plongées dans trente centimètres cubes de solution nitrique à 18°, m'ont fourni, après quatre heures, une coloration rouge équivalente, pour la rapidité de l'apparition et l'intensité, à celle d'une solu-

tion de 0 gr. 03 de nitrite de potassium dans trente centimètres cubes d'eau (1 ‰). Ce chiffre correspond à une absorption de 5,65 milligr. environ d'oxygène, c'est-à-dire de quatre centimètres cubes de ce gaz.

Dans l'essai suivant, la quantité de nitrite, fut déterminée par la méthode de M. Chabrier :

L'acide nitreux, mis en liberté par une petite quantité d'acide sulfurique, décompose l'iodure de potassium; il se produit de l'iode en quantité proportionnelle à l'iodure décomposé. De l'amidon introduit dans la liqueur se colore en bleu. Grâce à cette coloration, on peut doser l'iode au moyen d'une dissolution titrée d'hyposulfite de soude; celle-ci provoque la reformation d'iodure et la disparition de la coloration bleue.

Le 1^{er} octobre 1890, à midi, je prends 139 graines de pois en germination, de la variété employée dans l'expérience précédente. Elles pèsent 70 grammes et ont absorbé environ leur poids d'eau pendant l'imbibition. Ces graines sont immergées dans un matras rempli jusqu'au col, et contenant 270° d'une solution de nitrate de potassium à 1 ‰ préalablement bouillie et refroidie.

Après quatre heures à 18°, la quantité d'acide nitreux produite est de 69,74 milligrammes, correspondant à 126,4 mgr. de nitrite de potassium et à 24 mgr. d'oxygène; ce dernier chiffre représente un volume de 16,8 centimètres cubes.

Abstraction faite du nitrite qui est resté à l'intérieur des graines, on a, pour la quantité de nitrite de potassium dissoute dans le liquide extérieur, $\frac{126}{270000}$, soit un peu moins de $\frac{1}{2000}$.

Il n'est pas sans intérêt de remarquer que les quantités d'oxygène (5,6, et 24 mgr.) enlevées au nitrate dans ces deux essais et mesurées par deux procédés différents, sont à peu de chose près proportionnelles aux nombres des graines employées (45 et 139). On peut donc les admettre comme étant l'expression assez exacte de l'activité réductrice des graines de pois en germination.

II

RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES TUBERCULES ET AUTRES
ORGANES CHARNUS.

Le pouvoir réducteur des tubercules n'est pas moins facile à mettre en évidence que celui des graines en germination.

Le 17 juin 1889, je prends un tubercule de pomme de terre récemment récolté et appartenant à la variété Marjolin. Je le coupe en tranches assez minces que je place au fond d'un cristallisoir avec quelques centimètres cubes de la solution de nitrate de potassium à 1 0/0. D'autres tranches sont introduites au fond d'un tube étroit sous une épaisse couche de la même solution. Le tout est placé à 24° dans un endroit obscur. Au bout d'une heure, le contenu du tube donne d'une manière assez marquée la réaction des nitrites, tandis que dans le cristallisoir il n'y en a point de traces. La réduction des nitrates est donc bien liée à la vie sans air. Après six nouvelles heures, le tube a cessé de renfermer des nitrites.

Des morceaux de pomme de terre placés au fond d'un tube avec de l'eau distillée donnent aussi la réaction des nitrites, mais elle est beaucoup plus faible que dans l'essai précédent. Cela tient à ce que la pomme de terre employée renfermait des nitrates, ainsi que je l'ai constaté avec la diphénylamine. Le radis rose a donné lieu à des observations analogues.

Le navet blanc (hâtif des Vertus), coupé en petits morceaux placés dans un tube avec la solution nitrique, la réduit également, mais à un degré plus faible que la pomme de terre. Le nitrite disparaît aussi par la suite.

Un très grand nombre d'essais ont été faits avec diverses espèces, dont les organes en expérience étaient laissés, pendant trois heures, dans la solution de nitrate à 1 0/0. Ce temps est insuffisant pour que les germes introduits dans la solution aient pu devenir très nombreux et provoquer des actions réductives. Le tableau suivant indique les résultats observés.

ESPÈCES ÉTUDIÉES.	RÉACTION NITREUSE.
Tubercule de topinambour,	assez forte.
— betterave,	faible.
— carotte,	nulle.
— chicorée à café,	faible.
— pissenlit,	—
— chou-rave,	—
— radis,	forte.
— <i>Stachys tuberifera</i> ,	assez faible.
Bulbe d'ognon blanc,	faible.
Pétiole de bette,	forte.
— chou,	assez forte.
— céleri,	faible.
— laitue,	—
— raifort,	forte.
Tige de <i>Chenopodium Quinoa</i> ,	—
— d' <i>Impatiens Balsamina</i> ,	—
— — <i>Roylei</i> ,	faible.
— d' <i>Amarantus melancholicus</i> ,	forte.
Pédoncule du fruit de courge,	—
Jeune fruit de courge,	faible.
Fruit de tomate,	forte.
Jeune fruit de piment,	assez forte.
— haricot nain,	faible
Fruit presque mûr d' <i>Ecbalium</i> ,	—
Chair de melon mûr,	—
Raisins blancs non mûrs,	très faible.
— mûrs,	—
Prune blanche presque mûre,	—
Pêche non mûre,	—
Pêche mûre,	nulle.
Poire et pomme non mûres,	—

Un remarque générale a été faite relativement à la disparition complète des nitrites au contact des organes végétaux qui en avaient déterminé la formation. Tantôt elle a lieu au bout d'un temps assez court (six heures), tantôt la proportion des nitrites augmente graduellement pendant le premier jour, et ils ne disparaissent qu'après un temps assez long. Pour éviter alors l'intervention des bactéries, les tubes en expérience étaient placés dans une glacière où régnait une température de 5 à 6°.

Dans les essais de réduction des nitrates par les tubercules, on peut sans inconvénient ajouter l'acide sulfanilique ainsi que le chlorure de naphthylamine à la solution nitrique dans laquelle

plongent les tissus végétaux. On voit alors la coloration rouge caractéristique apparaître dans le liquide, et s'accroître de plus en plus au bout de quelques heures. Cet essai m'a surtout réussi avec des fragments de tomate.

Broyés rapidement dans un mortier, les tubercules ne perdent pas complètement leur pouvoir réducteur. Ainsi, des pommes de terre enlevées à des touffes en végétation ont été broyées assez finement, et introduites au fond d'un tube à essai sous la solution de nitrate. Trois heures plus tard, la réaction des nitrites est assez nette. Des tubercules de topinambour se sont montrés moins actifs dans les mêmes conditions.

Je tiens à noter que je n'ai pas observé de trace de nitrite dans les sucres, exprimés à la presse, des espèces suivantes : pomme de terre, topinambour, betterave, oignon et radis.

III

LES TUBERCULES RENFERMENT DES SUBSTANCES QUI RÉDUISENT LES NITRATES.

La propriété de réduire les nitrates est-elle liée à l'activité immédiate du protoplasme, ou bien existe-t-il dans les tissus des végétaux supérieurs des substances réductrices ? Je laisse de côté l'hypothèse de l'intervention des bactéries vulgaires vivant en symbiose avec les plantes supérieures, car d'après mes recherches¹, celles de M. Fernbach² et de plusieurs autres observateurs, il n'existe pas de ces bactéries dans les graines de maïs, d'orge, de haricot, dans les tubercules de pomme de terre, de betterave, de carotte, de chicorée, de navet et dans les fruits de tomate.

Il faut donc que les actions réductives provoquées par les plantes résultent des propriétés du protoplasme ou de substances particulières produites dans les cellules. Ainsi limitée, la question n'en est que plus intéressante, car les phénomènes de réduction des nitrates sont alors des aspects particuliers des phénomènes respiratoires.

* L'ancienne opinion de Lavoisier, qui faisait de la respiration

1. *Bulletin de l'Académie de Belgique*, 3^e série, t. X, p. 33, 1885.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, p. 567, 1888.

un simple phénomène de combustion directe de la matière vivante, est insuffisante. Beaucoup de physiologistes ont été conduits à admettre l'existence de substances capables de s'oxyder avec énergie aux dépens de l'oxygène du sang. Et l'on pourrait attribuer à ces corps très oxydables le pouvoir d'enlever l'oxygène combiné par des procès comparables à ceux que nous connaissons chez les organismes anaérobies.

Si vraiment il en est ainsi, il serait possible de suspendre l'activité vitale des tissus végétaux, même de les tuer, sans leur ôter le pouvoir de former des nitrites aux dépens des nitrates. Il n'est pas non plus impossible que l'on puisse parvenir à extraire les substances actives sans altérer leurs propriétés réductrices.

J'ai essayé de résoudre ce double problème.

Pour observer des actions réductives après la mort, on peut avoir recours au chauffage des grains ou des fragments de tubercules, que l'on plonge ensuite dans la solution de nitrate. Le résultat est assez variable et dépend du degré et du temps de chauffage.

Des graines de pois et de haricot en germination, des fragments de fruits de tomate et de pétioles de poirée ont été chauffés à sec à 55° pendant trente minutes, puis immergés dans la solution de nitrate durant trois heures. Avec la tomate, aucune trace de nitrite n'a été observée ; la poirée et le haricot ont fourni une réaction faible, et le pois une réaction presque nulle.

Des fragments de pomme de terre chauffés pendant cinq minutes à 100° ont encore donné une légère réaction nitreuse.

Au lieu de chauffer les tissus végétaux, il est préférable de les soumettre à l'influence de liquides dont l'action, d'abord paralysante ou anesthésique, devient ensuite mortelle.

Dans deux tubes à essais, je mets des morceaux de pomme de terre fraîchement coupés. Dans l'un, j'introduis quelques gouttes d'éther absolu, dans l'autre quelques gouttes de chloroforme. Les deux tubes sont fermés au moyen de bouchons fortement serrés. Deux heures plus tard, je lave rapidement à l'eau distillée les morceaux de tubercules et les immerge aussitôt dans la solution nitrique. Le pouvoir réducteur n'a nullement disparu ; au contraire, il est devenu plus prononcé sous l'influence des vapeurs anesthésiques. Dans le tube qui

avait reçu primitivement de l'éther, il s'est produit au bout de deux heures, à 20°, des nitrites en quantité très notable. La réaction est un peu moins nette dans le tube au fond duquel j'avais versé quelques gouttes de chloroforme.

La pulpe de tomate, traitée de la même manière que la pomme de terre, n'a donné qu'une très légère réaction nitreuse après avoir été traitée par l'éther, et aucune trace après l'action du chloroforme.

Les tissus soumis à l'action des vapeurs d'éther et de chloroforme, dans les conditions que j'ai indiquées, sont tués. Ce qui le prouve, c'est la rapidité avec laquelle ces tissus brunissent au contact de l'air, modification corrélatrice de la mort chez la pomme de terre.

Néanmoins, j'ai tenu à rendre mes expériences plus probantes encore par l'immersion complète des tissus végétaux dans le chloroforme, l'alcool et l'éther. Je versais ces liquides sur des fragments de tubercules de pomme de terre et je les laissais pendant une demi-heure ou une heure. Ils étaient ensuite remplacés par la solution de nitrate et, pour chasser l'air dissous, je faisais passer un courant d'hydrogène. Après deux ou trois heures de repos, j'ai constaté que le pouvoir réducteur vis-à-vis du nitrate est singulièrement exalté par l'alcool et l'éther, et qu'il l'est moins par le chloroforme. L'expérience suivante nous éclairera complètement sur ce point.

Dans cinq tubes, j'introduis des fragments de pomme de terre, qui sont recouverts d'alcool absolu en A, de chloroforme en B, d'éther en C, d'eau distillée en D, pour servir de témoin. Après une demi-heure, je décante ces divers liquides pour y substituer la solution de nitrate. Quant au tube E, il fut chauffé pendant cinq minutes à 100° et rempli ensuite de la même solution. Après trois heures de séjour à 10°, la réaction des nitrites est très nette dans A et B, assez nette dans C, légère dans D et très légère dans E.

L'expérience précédente a été répétée plusieurs fois avec la pomme de terre, la tomate et les graines de pois en germination. Ces deux dernières espèces ont donné des résultats moins nets.

Il convient de faire remarquer que l'alcool, l'éther et le chloroforme employés dans ces expériences étaient sans action réductrice sur les nitrates.

J'ai aussi essayé de détruire la vitalité des cellules de pomme de terre par l'immersion dans l'alcool méthylique et le cyanure de sodium en solution à 1 0/0. L'un et l'autre tuent rapidement les tissus, mais l'activité réductrice de ceux-ci sur les nitrates est beaucoup moindre que lorsqu'on se sert de l'alcool éthylique. Sous l'influence de l'acide cyanhydrique obtenu par la trituration des graines d'amandes amères, le pouvoir réducteur des graines germées de pois et de lupin blanc est supprimé d'une manière à peu près complète.

L'essence de moutarde donne des résultats encore plus concluants. Si dans un matras bien bouché et rempli de graines de pois ou de lupin blanc, immergées sous la solution nitrique, on introduit quelques gouttes de cette essence, on n'observe aucune trace de nitrite, même après un jour ou deux. Au contraire, des fragments de pomme de terre, plongés dans une solution de nitrate additionnée d'une petite quantité d'essence de moutarde, donnaient après trois heures une réaction nitreuse des plus marquées.

Il existe donc une différence incontestable entre les graines en germination et les tubercules au point de vue du pouvoir réducteur des nitrates. Les graines le perdent presque entièrement sous l'action des substances paralysantes ou toxiques; quant aux tubercules, surtout ceux de la pomme de terre, ces agents augmentent beaucoup leur propriété réductrice à l'égard des nitrates.

L'hypothèse relative aux substances réductrices se trouve confirmée par une série d'essais faits avec le suc des racines de fève (variété désignée sous le nom de fèverole).

IV

RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES SUCS VÉGÉTAUX.

Le 25 juin 1889, je récolte dans un champ très fertile quelques kilogrammes de racines de fèverole portant une grande quantité de nodosités. On sait maintenant que ces protubérances sont produites par un microbe particulier. Les racines sont lavées, égouttées, légèrement broyées, puis soumises à une très

forte pression. Elles laissent écouler un liquide qui noircit rapidement à l'air.

Deux centimètres cubes de ce liquide, ajoutés à une solution de nitrate de potassium en quantité suffisante pour avoir un mélange transparent, donnent au bout de cinq minutes une réaction très nette des nitrites. La rapidité avec laquelle le phénomène s'accomplit exclut l'intervention directe des microbes renfermés dans les nodosités de la fève. D'ailleurs, la production de nitrite se fait encore lorsque le suc a été filtré sur une bougie de porcelaine. Il est vrai que la filtration a diminué le pouvoir réducteur du liquide, ce que j'attribue à l'oxydation qui s'est faite pendant l'opération.

Le suc chauffé à l'ébullition pendant cinq, vingt ou trente minutes se colore encore en rose, sans addition de nitrates, lorsqu'on y ajoute les réactifs des nitrites. Même après un chauffage modéré, la coloration est plus forte que dans le suc laissé à la température ordinaire; un chauffage prolongé diminue l'intensité de la réaction.

Cette remarque m'avait vivement surpris et, pendant quelque temps, je me suis demandé si les substances réductrices du suc de fève pouvaient résister à l'ébullition. Il n'en est rien. Le suc que j'étudiais et qui, comme je l'ai dit, provenait de racines récoltées dans un champ, renfermait des nitrates. Ces sels mis en présence des matières réductrices par suite de la destruction des tissus sont réduits en nitrites à l'abri de l'air. L'augmentation que j'ai indiquée dans la proportion de nitrite, résulte simplement de l'influence exercée par un chauffage modéré sur les phénomènes réducteurs. L'élévation de température accroît d'abord la proportion des nitrites formés; mais l'ébullition prolongée les fait ensuite disparaître.

Les essais que je viens de rapporter, confirment assurément l'hypothèse d'une matière avide d'oxygène capable d'enlever ce corps, soit à l'air environnant, soit à des combinaisons oxygénées telles que les nitrates.

L'oxydation aux dépens de l'air paraît plus facile que la réduction des nitrates. On s'en aperçoit lorsque le suc de fève chauffé à 120° est conservé pendant un jour ou deux. Il continue à devenir plus foncé, ce qui indique que l'oxydation n'était pas terminée, mais il ne réduit plus les nitrates.

Après avoir été broyée, la pomme de terre continue également à noircir longtemps après qu'elle n'a plus d'action réductrice sur les nitrates.

Le suc de fève conservé dans la glace pendant vingt heures réduit encore les nitrates; mais chauffé après ce laps de temps, il perd cette propriété. Le chauffage a donc pour effet de hâter le moment où le pouvoir de réduction est épuisé par suite de l'accroissement des actions oxydantes. Il en est de même de l'exposition du suc à l'air sous une faible épaisseur.

Une deuxième série d'expériences avec le suc de fève a donné des résultats assez différents de ceux que je viens d'exposer.

Le 23 juillet, des racines de fève ont été arrachées dans le même champ où un mois auparavant j'en étais procuré. Elles ont été conservées fraîches dans la terre, transportées au laboratoire et soumises sans retard à la presse. Le suc ne réduit plus les nitrates qu'après plusieurs minutes de contact, mais il donne une faible réaction nitreuse au bout d'une demi-heure.

Comment expliquer cette divergence dans les résultats fournis par les sucres étudiés à un mois de distance? En juin, les fèves commencent à fleurir, et étaient encore à l'état de croissance. Il était naturel de supposer que les substances réductrices du suc diminuent pendant la dernière période de végétation des fèves. Désireux de m'assurer de l'exactitude de cette présomption, j'ai répété mes essais avec quelques racines de fève, qui, à la fin de juillet, commencent à fleurir. Le suc réduisait activement les nitrates. Le même fait fut encore vérifié avec des racines de fèves semées le 19 août, et dont les fleurs commencent à s'épanouir à la fin de septembre.

Je me suis assuré que la propriété réductrice du suc des racines de fève n'est pas localisée dans les nodosités, mais appartient surtout aux racines principales.

D'autres essais de réduction des nitrates ont été faits avec différents sucres végétaux. Le suc de cerises blanches s'est montré très actif à la température ordinaire; par contre, je n'ai pas observé de réaction nitreuse provoquée par le jus de groseilles blanches ¹ et d'orange.

1. Je ne me suis pas servi de fruits rouges pour éviter de confondre la coloration des jus avec celle des nitrites en présence de la naphthylamine.

Acide ou neutralisé avec la soude, le jus d'orange additionné de nitrite ne donne pas de coloration rouge avec l'acide sulfanilique et le chlorure de naphthylamine. Bien plus, cette coloration obtenue dans une solution de nitrite disparaît aussitôt que l'on y verse quelques gouttes de jus d'orange. Ce n'est pas cependant l'acide citrique qui occasionne cette décoloration; je m'en suis assuré. L'orange doit donc renfermer une matière qui empêche la réaction en question.

Les sucres de tomate non mûre et de pomme de terre ont présenté une faible réduction des nitrates. Pour ce qui est de la tomate, et je puis en dire autant d'un *Polyporus* dont l'espèce n'a pu être déterminée, le pouvoir réducteur des sucres est beaucoup plus faible que celui des tissus observés à l'état normal. Cela se conçoit aisément si l'on réfléchit à la facilité avec laquelle les sucres s'oxydent au contact de l'air, et à la difficulté de les exprimer à l'abri de l'oxygène. On peut aussi supposer que les substances réductrices sont retenues par les corps solides à la manière des diastases, et qu'il n'en passe qu'une faible proportion dans les extraits obtenus par pression.

Les phénomènes de réduction dont je m'occupe ont certainement quelque analogie avec les phénomènes d'oxydation lente que M. Pasteur a mis en lumière dans les moûts de vin et de bière et dans les vins. Dans les deux cas, il y a en présence des substances avides d'oxygène. Il était intéressant d'examiner si elles sont identiques. Pour cela, j'ai préparé du moût de bière et du liquide de touraillons très riches en matières extractives et qui, par conséquent, devaient donner un dépôt abondant à la suite d'un chauffage suffisant ou d'un repos prolongé. Ces décoctions étaient faites avec de l'eau distillée additionnée de nitrate de potassium à 1 0/0 et, après stérilisation, conservées sous une faible surface dans des vases très profonds. Le moût de bière, que j'avais préparé avec de l'orge germée dans le laboratoire, a donné une légère réaction nitreuse aussitôt après refroidissement. Plus tard, le nitrite a disparu, car il me fut impossible d'obtenir la même réaction. Le liquide de touraillons n'a pas donné trace de nitrite.

Une observation faite sur la pomme de terre porte à supposer l'existence dans les plantes vivantes de substances capables de

réduire les nitrates et d'autres matières qui n'ont pas ce pouvoir, mais qui cependant s'oxydent au contact de l'air. Lorsqu'on broie finement une pomme de terre dans un mortier, la pulpe ne réduit pas les nitrates. Cependant, il se forme dans les parties supérieures du vase une coloration d'abord rosée, qui, douze heures plus tard, devient brun foncé. Cette modification est certainement causée par l'influence de l'oxygène de l'air, car elle ne se fait pas dans le vide ni dans l'hydrogène.

V

EST-IL POSSIBLE D'EXTRAIRE LES SUBSTANCES QUI RÉDUISENT LES NITRATES?

Il résulte des expériences rapportées au chapitre III qu'il doit exister dans les tissus des graines et surtout des tubercules des substances qui réduisent les nitrates. Il semble dès lors qu'il soit facile de les extraire, mais on se butte à des difficultés expérimentales très sérieuses. En effet, les tissus vivants, aussitôt tués, doivent être broyés assez finement pour permettre l'action des liquides dissolvants. Or, cette opération ne peut se faire en présence de l'air, et ne réussit guère dans l'acide carbonique. Peut-être le vide et l'hydrogène pourraient donner des résultats plus satisfaisants, mais au prix de dispositifs fort compliqués.

Il est d'ailleurs probable que les propriétés réductrices disparaissent par l'effet de la trituration des tissus, qui met en contact immédiat les diverses régions cellulaires. Ces matières, en apparence si peu stables, ne tardent sans doute pas à se détruire dès qu'elles cessent d'être localisées et de se trouver dans des conditions particulières. Une telle opinion m'a paru se dégager de mes nombreux essais de séparation des substances réductrices.

L'un de ces essais mérite d'être consigné. Il tend à prouver que, sous l'influence des matières paralysantes ou toxiques, ce ne sont pas les substances réductrices qui se diffusent au travers des membranes cellulaires, mais plutôt les nitrates qui pénètrent à l'intérieur des cellules; ils y sont réduits, et les nitrites formés se répandent ensuite dans le liquide environnant.

Un kilogramme de pommes de terre est coupé en menus morceaux sous une couche d'eau assez épaisse; ces morceaux

sont introduits rapidement dans un grand ballon rempli d'eau distillée, qui a, au préalable, été bouillie pour expulser l'air dissous. Cinq centimètres cubes d'essence de moutarde sont ajoutés au liquide; le ballon est bouché hermétiquement et placé à l'étuve à 35°. Quarante-huit heures plus tard, l'action du liquide sur les nitrates est essayée sans succès. C'est donc à l'intérieur des cellules que s'accomplissent les phénomènes de réduction dans les tissus tués. Et pour extraire les substances actives, il est indispensable de les triturer très finement.

VI

RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES CORPS ORGANIQUES.

Quelle peut être la nature des substances réductrices contenues dans les tissus des plantes supérieures? En attendant qu'il soit possible de les isoler, il était tout indiqué de faire quelques essais de réduction de nitrates avec des corps organiques de composition déterminée.

Des mélanges d'acides malique, lactique, oxalique, citrique et tartrique à 10 0/0 et de nitrate de potassium à 1 0/0 ne donnent guère de nitrite à la température ordinaire; la réduction est beaucoup plus marquée si l'on chauffe à 100° ou 120°. Les oxalate, acétate et tartrate de potassium sont inactifs à toutes les températures. Quant à la saccharose, à la glycose et à la glycérine, elles réduisent le nitrate lorsqu'on les chauffe à 120°, sans doute parce que ces corps ainsi traités donnent lieu à la production de petites quantités d'acides organiques.

En un mot, l'action réductrice des acides les plus répandus chez les végétaux ne suffit pas à rendre compte des phénomènes de réduction des nitrates observés avec les graines et les tubercules. Cette action des acides organiques n'est pas non plus favorisée lorsqu'on fait agir de fortes pressions (10 à 12 atmosphères), afin de réaliser expérimentalement les pressions qui résultent des actions osmotiques intracellulaires.

L'action propre aux acides m'amène à dire quelques mots de l'influence de la nature de la réaction sur la réduction des nitrates par les tissus végétaux.

Des essais comparés ont été faits avec des graines de pois, de

lupin blanc et de haricot nain en milieux neutres, additionnés de potasse à 1 0/00, ou d'acide tartrique ou chlorhydrique à la même concentration. D'une manière générale, la production des nitrites a toujours été plus abondante dans les milieux alcalins ou neutres; en liquide acide, c'est le haricot qui a donné la réaction nitreuse la plus marquée.

L'influence de la réaction du liquide ambiant varie donc d'une espèce à l'autre, et résulte sans doute de la facilité plus ou moins grande avec laquelle les solutions acides pénètrent à l'intérieur des cellules.

VII

AU CONTACT DE MATIÈRES ORGANIQUES ACIDES, LES NITRITES DISPARAISSENT.

A plusieurs reprises, dans l'exposé de ces recherches, j'ai indiqué la disparition des nitrites produits par les graines et les tubercules. Le moment est venu d'en rechercher la cause.

L'essai avec la diphénylamine et la brucine prouve que si la réaction des nitrites n'est plus possible, celle des nitrates persiste. Dès lors, il était permis de supposer que les nitrites s'oxydent graduellement et se transforment en nitrates. Quelques essais vont nous éclairer sur ce point.

Des solutions de nitrite de potassium à 1/1000, 1/10000, 1/100000 dans l'eau distillée, conservées au contact de l'air, ne cessent, même après un mois, de donner la réaction nitreuse. Le chauffage à 100 ou 120° ne modifie en rien ce résultat.

Au contact des tissus végétaux, la disparition des nitrites est relativement rapide. Ainsi, dans un tube contenant une solution stérilisée de nitrate de potassium à 1/100000, j'introduis quatre pois stérilisés en germination; vingt et une heures plus tard, la réaction nitreuse est devenue très faible et disparaît complètement après un nouveau laps de temps de vingt-quatre heures.

La disparition des nitrites est plus rapide encore lorsqu'on en chauffe à 120° les solutions en présence de graines en germination ou de fragments de tubercules.

Au reste, la disparition des nitrites en présence des acides organiques n'a rien qui doive étonner. C'est, en effet, une pro-

priété bien connue des nitrites d'être décomposés par les acides et de donner de l'anhydride azoteux, qui, en présence d'eau, se décompose et fournit de l'acide nitrique et du bioxyde d'azote.

Aux yeux de plus d'un, il paraîtra peut-être incompréhensible que les nitrites, d'abord formés à l'intérieur des cellules, diffusés au dehors, soient enfin détruits au contact d'acides, qui évidemment proviennent du contenu cellulaire. On pourrait croire que les nitrites se décomposent au fur et à mesure de leur production. S'il n'en est pas ainsi, c'est parce que les diverses régions de la cellule ont une certaine indépendance les unes envers les autres. Selon toute vraisemblance, les nitrites prennent naissance dans le protoplasme, à réaction généralement alcaline, et séparé du suc cellulaire, à réaction acide, par une couche protoplasmique spéciale. La diffusion des nitrites pourrait donc commencer beaucoup plus tôt que celle des acides du suc cellulaire.

Il n'est pas sans intérêt de faire remarquer que, dans les expériences sur la réduction des nitrates, il importe de faire attention au moment choisi pour essayer les réactions des nitrites. Lorsqu'on attend trop longtemps, on s'expose à ne plus trouver trace de ces sels et à émettre une opinion contraire à la vérité.

VIII

RÉDUCTION DES NITRATES PAR LES ORGANISMES INFÉRIEURS.

Algues. La réduction des nitrates par les conferves, signalée autrefois par Schönbein ¹, est réelle.

Des filaments de *Cladophora* ont été placés, le 19 juin 1889, à midi, sous une solution de nitrate de potassium à 1 0/0, au fond d'un tube assez étroit; un examen microscopique n'a pas fait découvrir des bactéries parmi ces filaments. Après une demi-heure de séjour à l'obscurité, j'ai observé une réaction nitreuse assez nette, mais qui est beaucoup plus forte le lendemain matin. Le 20, à 10 heures, le tube est mis au soleil; des bulles gazeuses ne tardent pas à se dégager, et à 2 heures, les nitrites ont disparu sous l'influence de l'oxygène produit par les cellules à chlorophylle. Replacées à l'obscurité le même jour à 3 heures,

1. *Journal für praktische Chemie.* Bd. CV, p. 208, 1868.

les algues décomposent de nouveau le nitrate environnant en nitrite, qu'une nouvelle insolation fait encore disparaître.

L'expérience a réussi également avec plusieurs espèces d'*Œdogonium* et de *Spirogyra*.

Champignons. J'ai mis séparément, dans des tubes avec nitrate de sodium, des tranches du tissu hyménial et du tissu sus-jacent d'un *Polyporus* trop peu développé pour en déterminer l'espèce: il n'y avait pas encore de basidiospores.

Après deux heures d'immersion dans la solution nitrique, le tissu hyménial donnait une réaction très forte des nitrites. Celle-ci était beaucoup moins marquée dans le tube qui renfermait le tissu central du champignon, résultat qui s'explique par la différence d'activité des deux tissus au moment où les spores vont se former.

Le suc de ce *Polyporus* réduisait faiblement les nitrates après deux heures de contact.

Le *Polyporus squamosus*, dont les tissus sont très pauvres en suc, s'est montré sans action sur les nitrates. J'ai obtenu le même résultat avec les *Russula lepida*, *Hydnum repandum*, *Coprinus micaceus*, un *Hypholoma* et un *Craterellus*. Par contre, des fragments de chapeau de *Cantharellus cibarius* ont réduit assez nettement le nitrate après trois heures d'immersion.

Précédemment, j'ai indiqué dans ces *Annales* ¹ la réduction des nitrates par *Cladosporium herbarum*, *Dematium pullulans*, *Penicillium glaucum*, *Alternaria tenuis*, *Mucor racemosus*; dans les cultures des *Aspergillus niger* et *glaucus*, ainsi que de *Botrytis cinerea*, aucune trace de nitrite ne fut observée.

Quant aux Levures, leur pouvoir réducteur vis-à-vis des nitrates n'est pas très actif ². Cependant, on parvient à le mettre en évidence lorsqu'on cultive ces ferments dans des mélanges minéraux additionnés de nitrate et d'une petite quantité de sucre. Dans des liquides riches en sucre fermentescible, il n'y a pas réduction des nitrates, ce qui s'explique par la facilité avec laquelle les Levures dédoublent cet hydrate de carbone en alcool et anhydride carbonique.

Bactéries. La réduction des nitrates par les Bactéries a été l'objet de nombreux travaux, dont les principaux sont dus à

1. T. III, p. 371, 1889.

2. *Id.*, p. 365.

MM. Dehérain et Maquenne, Gayon et Dupetit, Frankland, Warington. Ces deux derniers auteurs ont montré qu'un très grand nombre d'espèces bactériennes peuvent réduire les nitrates. J'ai eu l'occasion de faire des constatations analogues avec des bactéries pathogènes, chromogènes et autres. Je ne mentionnerai que quelques faits qui me paraissent avoir une certaine portée générale.

Des cultures faites dans du bouillon de veau additionné de 1 0/0 de nitrate avec *Bacillus subtilis*, *Tyrophrix tenuis*, *Bacillus mesentericus* ont prouvé que ces trois races, nettement aérobies, sont incapables de produire des nitrites aux dépens des nitrates. Nouvelle preuve que cette propriété est liée à la vie sans air.

Au reste, l'une des espèces qui s'étaient montrées les plus réductrices a été cultivée simultanément dans un matras à fond plat et dans un matras Pasteur rempli jusqu'au goulot. Après vingt heures, il n'y avait pas trace de nitrite dans la première culture, tandis que la seconde en renfermait une quantité très appréciable.

Les espèces qui possèdent à un haut degré le pouvoir de réduire les nitrates, donnent la réaction des nitrites après un temps relativement assez long. Ainsi une culture d'un bacille banal, mais très actif sur les nitrates, fut additionnée de son volume d'une solution stérile de nitrate sodique à 1 0/0. Une heure et demie plus tard, il n'y avait point trace de nitrite; après trois heures, j'ai observé une faible réaction nitreuse qui, une heure plus tard, était beaucoup plus nette.

Cette expérience tend à faire supposer que si les bactéries fabriquent des substances réductrices comme les plantes supérieures, celles-ci ne semblent pas être sécrétées au dehors des cellules à la manière des diastases produites par beaucoup de microbes (invertine de la levure et de l'*Aspergillus niger*).

Il est même très vraisemblable que de telles substances n'existent pas chez les Bactéries; si l'on ajoute à une culture d'une espèce réductrice une solution nitrique et quelques gouttes d'essence de moutarde, aucune production de nitrite n'est jamais observée.

Une observation que j'ai faite également dans mes cultures de bactéries réductrices des nitrates, c'est que les nitrites finissent par disparaître dans le milieu nutritif lorsque celui-ci est

acide. Mais si l'on y a ajouté un peu de carbonate de chaux, la disparition des nitrites n'a pas lieu, même après un laps de temps très long. En somme, chez les microbes comme chez les plantes supérieures, les nitrites sont détruits par les acides qui existent dans le milieu environnant.

Enfin je me suis aussi assuré que les nitrites ne sont nuisibles aux bactéries qui les produisent, qu'après décomposition par un acide avec mise en liberté d'acide nitreux. Celui-ci, à dose relativement minime ($\frac{1}{5000}$), paralyse le développement des Bactéries. La même observation a été faite pour les Levures¹. Toutefois les bactéries s'habituent graduellement aux nitrites en milieux acides, et peuvent continuer à vivre dans des liquides qui en renferment des doses assez notables.

Les recherches exposées dans ce mémoire peuvent être résumées de la manière suivante :

I. Le pouvoir de réduire les nitrates existe chez les plantes supérieures, les Algues et les Champignons, aussi bien que chez les Bactéries.

II. Il est facile de mettre cette propriété en évidence avec les graines en germination et les tubercules.

III. Dans les plantes supérieures, il existe des substances capables de réduire les nitrates en nitrites, même après la mort des cellules.

IV. La réduction des nitrates par les végétaux est, comme la fermentation alcoolique, une conséquence de la vie qui se continue dans un milieu privé d'oxygène à l'état libre.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, p. 367.

REVUES ET ANALYSES

L'ALCOOL EST-IL UN ALIMENT ?

REVUE CRITIQUE

MAGENDIE. *Précis élémentaire de Physiologie*, et *Bull. de la Société Philom.*, 1811. — BOUCHARDAT et SANDRAS. De la digestion des boissons alcooliques et de leur rôle dans la nutrition. *Ann. de Ch. et de Phys.*, 3^e S., t. XXI. — TIEDEMANN, *Zeitschr. f. Phys.*, t. I, p. 2. — ROYER-COLLARD. De l'usage et de l'abus des boissons fermentées. Thèse de 1838. — WOHLER. *Journal des progrès*, 1827, t. II. — KLENCKE. Recherches sur l'action de la consommation de l'eau-de-vie sur l'organisme vivant. — DUCHEK. Sur la manière d'être de l'alcool dans l'organisme animal. — PERRIN, LUDGER-LALLEMAND et DUROY. Du rôle de l'alcool et des anesthésiques dans l'organisme. Paris, 1860. — PERRIN. De l'influence des boissons alcooliques prises à doses modérées sur la nutrition. *Comptes rendus de l'Ac. des Sc.*, 1864. — ALBERTONI. Sur la transformation de l'alcool et de l'aldéhyde dans l'organisme. *Arch. Ital. de Biologie*, IX, n^o 2.

Les problèmes scientifiques sont toujours sujets à révision, surtout lorsque dans leur énoncé entre un mot difficile à définir exactement. Avant de se demander si l'alcool est un aliment, il serait utile de savoir ce que c'est qu'une matière alimentaire, et à quels caractères on la reconnaît. Nos aïeux appelaient de ce nom tout ce qui sert à la nourriture de l'homme. Le sel, par exemple, dont la privation est si difficile à supporter, était pour eux un aliment comme les autres, et cette notion ne pouvait qu'être acceptée par les alchimistes du moyen âge, qui ne savaient guère ce que c'était qu'une matière organique, mais connaissaient les matériaux salins du corps humain. Dès que la chimie a eu pris son essor, on a rapidement appris à distinguer les aliments azotés et non azotés, et un progrès de plus a montré que ces divers aliments ne semblaient pas se comporter de la même façon dans l'organisme.

Les aliments non azotés, disait-on, dégagent beaucoup de chaleur en brûlant, c'est-à-dire en se transformant sous l'influence de l'oxygène en eau et en acide carbonique : cette transformation paraît identique à celle qui se réalise dans un être vivant qui respire ; il paraît naturel de lui attribuer la production de la chaleur animale. Les substances

azotées, au contraire, dégagent peu de chaleur en brûlant. Quand on les attaque par les méthodes ordinaires de la chimie, on en retire des produits divers, mais jamais l'urée, c'est-à-dire la forme qu'elles prennent pour s'éliminer de l'organisme. Elles semblent dès lors y avoir subi une élaboration spéciale. Elles sont *plastiques*, c'est-à-dire qu'elles entrent pour une période plus ou moins longue dans la constitution de nos tissus, dont elles entretiennent, dit Liebig ¹, « les fonctions vitales, en réparant les parties organisées qui ont été consommées et évacuées. Elles conservent les organes et entretiennent ainsi la production de la force. Les principes non azotés entretiennent la respiration, et conséquemment la chaleur. Ces derniers sont donc des *agents de respiration*. »

Je n'ai pas à insister pour le moment sur la valeur propre de cette théorie. Je me borne à faire remarquer que, pour elle, le caractère propre de l'aliment était de se détruire, de perdre son individualité dans l'organisme. Qu'il prit rapidement et définitivement la forme d'eau et d'acide carbonique comme les aliments hydrocarbonés, ou lentement et temporairement une forme vivante comme les aliments azotés, un aliment absorbé et utilisé devait bientôt cesser d'être lui-même pour prendre un autre aspect ou de nouvelles propriétés. Dans cette conception, le sel marin, qui entre et ressort en nature, cessait d'être un aliment pour devenir un condiment, mais, ce qui est plus grave, c'est qu'on pouvait disputer aux matières grasses leur qualité alimentaire, car on les voit absorbées en nature, et on les retrouve intactes dans le sang et les organes. La saponification intestinale à laquelle on les croyait nécessairement soumises, et dont j'ai contesté l'utilité, se révèle, d'après les derniers travaux, non seulement comme un phénomène sans importance, mais comme plutôt nuisible. Sans doute elles peuvent, dans certaines circonstances ou dans certains tissus, être brûlées ou détruites. Un individu qui maigrit les consomme, et quelque fois très vite, mais dans l'état physiologique, on n'aperçoit chez elles aucune trace sensible de cette transformation rapide que l'on a fait entrer sans y songer dans la définition du mot aliment.

Vis-à-vis de l'alcool, cette définition inconsciente, presque instinctive, a eu des conséquences plus curieuses. Cette substance a été de tous temps si recherchée par tous les peuples, que sa qualité alimentaire n'a fait de doute pour personne. On lui a donc appliqué la théorie. Magendie avait constaté que l'alcool passait dans le sang au même titre que les autres aliments élaborés par la digestion. Wöhler d'abord, Bouchardat et Sandras ensuite, avaient trouvé d'un autre côté qu'il

1. *Nouvelles lettres sur la chimie*, trad. Gerhardt, 33^e lettre.

ne s'éliminait pas par l'urine. Restait, il est vrai, la voie pulmonaire, par laquelle Magendie avait constaté la sortie d'un peu d'alcool, mais Bouchardat et Sandras avaient contesté ce fait, et comme ils ne trouvaient du reste dans le sang ou les tissus aucun des produits ordinaires de l'oxydation de l'alcool, ni aldéhyde, ni acide acétique, ils en avaient conclu que cette substance se détruisait dans l'organisme, et qu'elle était par conséquent alimentaire.

Ces conclusions, appuyées sur des constatations analogues faites par d'autres savants, étaient passées dans la science, lorsqu'elles ont été contestées par un travail signé de MM. Perrin, Ludger-Lallemand, et Duroy, dont la conclusion était que l'hypothèse du rôle alimentaire de l'alcool n'avait d'autre base scientifique qu'une erreur expérimentale.

Si on admet les termes de la définition posée plus haut pour le mot aliment, la démonstration de MM. Perrin, Lallemand et Duroy semble en effet topique. L'alcool arrive il est vrai dans le sang comme les produits absorbés dans le canal digestif, mais au lieu d'en disparaître ou de s'y transformer, il y fait de longs séjours. 700 grammes de sang artériel soustrait par la section des carotides à des chiens alcoolisés et plongés dans l'ivresse, une heure et demie après l'ingestion, ont donné 5 grammes d'un produit offrant tous les caractères de l'alcool et brûlant à l'air libre. On en a retrouvé de même après 18 heures et lorsque les signes de l'ivresse était dissipés; de même chez un homme qui avait succombé aux complications habituelles de l'ivresse, trente-deux heures après avoir bu une grande quantité d'eau-de-vie, et alors que les effets directs de l'intoxication avaient disparu. L'alcool séjourne donc dans le sang qui le promène longuement dans les divers tissus, et lui permet de se localiser dans ceux pour lesquels il possède une affinité d'élection, la substance nerveuse, par exemple, qui, pendant la durée de l'alcoolisation, renferme, à poids égal, plus d'alcool que d'autres organes vasculaires et que le sang lui-même. 440 grammes de substance nerveuse, appartenant à des chiens sacrifiés pendant l'ivresse, ayant été soumis à la distillation, après avoir été débarrassés de leurs enveloppes vasculaires, soigneusement lavés, et broyés dans un mortier avec 200 grammes d'eau, ont donné 3^{gr},25 d'alcool capable de brûler, tandis qu'on n'en trouve que 3 grammes environ dans la même quantité de sang analysée dans des conditions analogues. Chez le mort alcoolique dont nous avons parlé plus haut, 20 grammes de substance nerveuse gardaient assez d'alcool pour qu'il ait été possible de le doser, et de constater que 20 grammes de sang en contenaient trois fois moins. Enfin l'alcool s'accumule aussi dans le foie qui, à poids égal, en contient plus que le cerveau, quand l'alcool a été absorbé par l'estomac.

Dans les organes nerveux, l'alcool se comporte en « agent dynamique » modifiant, pervertissant ou abolissant leurs fonctions. Mais il s'en élimine peu à peu, toujours en nature, car on le retrouve dans l'urine et les produits de la respiration. Cette élimination commence peu d'instants après l'ingestion, et se continue tant qu'il existe de l'alcool dans l'économie. Il s'opère aussi une élimination abondante par les poumons, qui se continue pendant une durée approximative de huit heures. Enfin l'alcool s'échappe aussi par la peau, et il est même permis de croire que c'est par cette voie qu'il en sort le plus chez l'homme, bien qu'il soit difficile d'en donner la preuve directe.

J'ai insisté longuement sur les résultats de ce travail parce que la science en a accepté le bien fondé, sans se demander suffisamment quelle était la valeur des preuves. Il y avait pourtant, dans les expériences citées, quelques particularités qui pouvaient surprendre. Ainsi, on avait le droit d'être étonné que cette élimination de l'alcool par l'urine, si facilement constatée par MM. Perrin, Lallemand et Duroy, eût échappé à Wöhler. C'est qu'elle n'est pas constante. C'est ce qu'ont vu divers savants, Baudot, Hugo, Lauder-Brunton, Lussana, Albertoni, Dujardin-Baumetz et Jaillet. Dans mon laboratoire, on n'a jamais trouvé d'alcool dans l'urine de ceux qui y travaillent, lorsqu'elle était émise quelque temps après l'ingestion d'une boisson alcoolique. Aussitôt après l'absorption d'un ou deux petits verres, on en rencontre parfois. En revanche on en a trouvé en quantité sensible dans l'urine normale d'un garçon ayant l'habitude de boire. Quand MM. Perrin, Lallemand et Duroy en ont obtenu en quantités sensibles dans l'urine ou dans le sang, c'est à la suite d'absorptions d'alcool exagérées. Les doses qu'ils faisaient ingérer à leurs chiens d'expérience étaient presque des doses mortelles : quelques-uns même de leurs animaux sont morts pendant l'expérience. C'est sur des animaux soumis à ce traitement qu'a été prélevé le sang dans lequel on a retrouvé les quantités énormes d'alcool que nous avons signalées plus haut : on peut donc dire qu'il n'y a là rien de physiologique, rien qui autorise à conclure que, dans les conditions ordinaires, l'alcool ne soit pas un aliment.

Il aurait fallu montrer que tout ce qui est ingéré s'élimine en nature, et c'est ce qu'on n'a pas fait. On a dit : il s'en échappe de l'organisme, donc l'alcool ne s'y transforme pas, donc il n'est pas un aliment. Mais cet argument ne nous touche plus.

C'est que nos idées sur le mot aliment se sont transformées depuis que MM. Perrin, Lallemand et Duroy écrivaient leur mémoire, et que leurs contemporains en acceptaient les conclusions. Nous avons étendu, dans une certaine mesure, aux aliments hydrocarbonés la propriété plastique réservée autrefois aux aliments azotés. Nous savons mainte-

nant que, dans un grand nombre de cas au moins, la destruction ne suit pas de près l'ingestion ; que les cellules se font des réserves, qu'elles se créent même parfois, aux dépens des matières qu'on leur offre, des aliments nouveaux qu'elles accumulent dans leur protoplasme, et qu'elles remplacent, dans leur vie physiologique, à mesure qu'elles les utilisent. Pour tout dire en un mot, le mouvement de nutrition est intracellulaire, et la cellule s'interpose comme une sorte de volant entre l'aliment qu'on lui offre et qui représente la force, et l'aliment qu'elle consomme et qui préside au travail produit.

La destruction rapide ou immédiate a donc cessé d'être un des caractères de la matière alimentaire. On peut même remarquer que la plupart des aliments que nous consommons sont des produits de vie cellulaire : sucres, amidon, caséine du lait, fibrine des muscles. Tous ces aliments de premier ordre sont sécrétés ou produits par des cellules, et sont par là inattaquables, c'est-à-dire non alimentaires pour la cellule qui les a formés. La qualité alimentaire n'est donc pas attachée à la substance elle-même. Il faut, pour la définir, viser en même temps la nature de la cellule vivante à laquelle on l'offre pour aliment. Par exemple, dans le monde des infiniment petits, qui a tant contribué à nous donner des idées justes sur la nutrition des animaux supérieurs, l'alcool n'est pas alimentaire pour les cellules de levûre, mais l'est pour celles du *mycoderma vini* ou du *mycoderma aceti*. Il n'est même pas nécessaire de recourir à des êtres différents pour manifester des différences dans la qualité alimentaire d'une même substance : on peut prendre pour cela les différents tissus d'un même être. Pour les cellules de l'appareil galactogène, la caséine du lait n'est pas une substance alimentaire : elle l'est pour l'appareil digestif de l'animal qui l'a fabriquée. Enfin un même tissu peut, à de certains moments, consommer et à d'autres refuser le même aliment. Le sucre de canne se dépose une année dans les cellules de la racine de betterave, et y est consommé l'année suivante.

Nous verrions se compliquer encore davantage la signification du mot aliment, si nous poussions plus loin cette étude, mais nous en avons dit assez pour prouver que l'argument mis en avant par MM. Perrin, Lallemand et Duroy a perdu toute valeur, et qu'une matière alimentaire peut séjourner longtemps dans l'organisme, y attendre le moment de servir, se fixer temporairement sur certains tissus, s'éliminer en même temps, si elle est dialysable ou volatile, par les divers émonctoires, et conserver pourtant sa qualité de matière nécessaire ou simplement utile au bon fonctionnement de l'un des organes de l'être vivant qui l'a consommée. On voit aussi de quelles précautions il faut s'entourer pour attribuer ou contester à une substance quelconque la qualité alimentaire. Celle qui l'est pour le chien peut très bien ne pas

l'être pour l'homme ou inversement, celle qui l'est pour tel individu peut ne pas l'être pour tel autre; celle qui l'est en santé peut ne plus l'être pour la maladie, etc.

Quelle est donc, dira-t-on, la caractéristique de l'aliment et comment peut-on le définir? La définition la plus conforme à l'état actuel de la science est celle-ci : est réputé aliment tout ce qui contribue à assurer le bon fonctionnement de l'un quelconque des organes d'un être vivant. A ce titre, l'eau, le sel sont des aliments, bien qu'ils ne subissent aucune transformation dans l'organisme. L'alcool est un aliment, bien que ses transformations puissent être lentes, et par cela seul qu'il peut servir dans certaines conditions à exciter l'activité cérébrale.

Cette excitation peut avoir et a réellement sa répercussion sur les autres organes. La résistance au froid, le travail musculaire peuvent s'en trouver augmentés. M. Perrin a constaté lui-même et sur lui-même une influence sur le fonctionnement de l'appareil respiratoire. D'autres savants ont confirmé ses résultats. Je ne veux pas insister sur la signification physiologique de ces expériences. Je me borne à leur demander la preuve d'une modification d'ordre général survenant dans l'individu à la suite de l'ingestion de boissons alcooliques, et je m'en autorise pour attribuer à l'alcool cette qualité alimentaire que M. Perrin leur avait refusée. Il en est ainsi souvent dans la science : les faits restent et les conclusions changent.

Il resterait à traiter la question des transformations que subit l'alcool ingéré. Divers savants ont naturellement recherché s'il ne fournissait pas de l'aldéhyde et de l'acide acétique. Les uns en ont trouvé, les autres non. Les recherches de l'acide acétique semblent un peu vaines. Comment distinguer celui qui provient de l'alcool de celui que peuvent donner d'autres aliments, sous l'influence des putréfactions intestinales, ou de celui qu'excrètent les tissus? Pour l'aldéhyde, la relation avec l'alcool est un peu plus étroite, mais non nécessaire. D'ailleurs comme pour l'alcool, on en trouve parfois, et parfois on n'en trouve pas. Les recherches d'Albertoni ont montré qu'elle s'élimine rapidement, et en totalité ou à peu près, par les poumons et par les reins, quand elle est introduite directement dans l'organisme. Mais même de ce fait, je ne voudrais pas conclure que ce n'est pas un aliment et que c'est un poison. Les peptones sont bien certainement alimentaires, et pourtant elles sont toxiques quand on les introduit directement dans la circulation générale, et pourtant elles s'éliminent aussi par les urines. Nous ne savons guère ce qui se passe dans les profondeurs de l'organisme, et si nous prétendons le deviner en contrôlant les entrées et les sorties, nous ressemblons à un statisticien qui prétendrait découvrir tout ce qui se passe dans Paris en comptant ce qui y entre par l'octroi, et ce qui en sort par le grand égout collecteur.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte de rage pendant le traitement.

GROSSOUS (Jean), 52 ans, cultivateur à Fedj-M'zala, département de Constantine. Mordu le 13 octobre 1890 à 11 heures du soir :

1^o A l'avant-bras droit, à nu, et à la main droite, une trentaine de morsures, piqûres, éraflures, disséminées sur tout l'avant-bras et sur la main ; 2^o à l'avant-bras et à la main gauches, une vingtaine de morsures, semblables aux précédentes et également faites à nu ; 3^o au poignet gauche, une morsure très forte et très pénétrante, ayant beaucoup saigné ; 4^o à la cuisse gauche, deux morsures par éraflures moyennes, ayant bien saigné. Le pantalon a été déchiré.

Il y a eu lutte prolongée entre Groussous et son chien, dans un couloir de 3 mètres de long sur 1 mètre de large. Groussous est enfin parvenu à maîtriser l'animal et à l'attacher.

Le chien mordeur a été reconnu enragé par M. Manin, vétérinaire à Constantine. Il avait été mordu le 7 septembre par un chien enragé.

Mis en traitement le 22 octobre, neu jours après les morsures, Groussous est pris le 8 novembre de douleurs dans le bras gauche. Le 10 novembre, il est conduit à l'hôpital Necker, où il meurt avec tous les symptômes de la rage le 12, à 5 heures du matin.

Personnes traitées mortes de la rage.

M^{lle} BAUDINO (Thérèse), 12 ans, demeurant à Cannes (Alpes-Maritimes). Mordue le 30 juillet à 7 heures 1/2 du soir, à la jambe gauche, à travers un bas de laine à larges mailles : quatre morsures, ayant assez saigné, à la face interne. Les blessures n'ont pas été cautérisées.

Le chat mordeur a été reconnu enragé par M. Ponsone, vétérinaire à Cannes, d'après les renseignements recueillis, et à l'autopsie.

M^{lle} Baudino a été traitée du 4 au 18 août. Le 3 septembre, elle présente des symptômes de rage, hydrophobie, aérophobie. Elle était malade depuis huit jours ; son caractère était changé. La mort est survenue le 4 septembre, à 11 heures du matin. (Rapport de M. le D^r L. Girard, à Cannes.)

FOURNÈS (Joseph), 14 ans, chevrier à Guyotville (Alger), mordu le 1^{er} août 1890, à 11 heures du matin. Une morsure très pénétrante, ayant beaucoup saigné, siégeant sur le lobule du nez, l'aile gauche et la sous-cloison. Cette blessure n'a pas été cautérisée.

Le chien mordeur a été reconnu enragé d'après les commémoratifs et à l'autopsie, par M. Claude, vétérinaire à Alger.

Fournès a été mis en traitement du 8 août au 27 août. Le 11 octobre, il présente les premiers symptômes de la rage : hydrophobie, céphalalgie violente. La mort est survenue le 14 octobre, à 3 heures du matin. (Rapport de M. le docteur O. Bonis, à Guyotville.)

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE ¹ DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — OCTOBRE 1890.

	A		B		C	
Morsures à la tête { simples	»	1	»	»	»	»
et à la figure { multiples	»	1	»	2	»	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»
— inefficaces	»	»	»	»	1	»
Pas de cautérisation	1	»	2	»	»	»
Morsures aux mains { simples	»	2	»	10	»	6
{ multiples	»	7	»	18	»	5
Cautérisations efficaces	1	»	»	1	»	1
— inefficaces	3	»	»	15	»	6
Pas de cautérisation	5	»	»	12	»	4
Morsures aux mem- { simples	»	1	»	11	»	2
bres et au tronc { multiples	»	4	»	13	»	4
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»
— inefficaces	5	»	»	10	»	4
Pas de cautérisation	»	»	»	13	»	1
Habits déchirés	2	»	»	19	»	5
Morsures à nu	3	»	»	5	»	1
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	10	10	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»
— inefficaces	»	»	»	4	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	5	»	»
Habits déchirés	»	»	»	4	»	»
Morsure à nu	»	»	»	10	»	»
Totaux. { Français et Algériens .	15	15	59	64	16	18
{ Etrangers	»	»	5	»	2	»
	A		B		C	
TOTAL GÉNÉRAL	97					

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 78 fois; chats, 9 fois; loups, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.